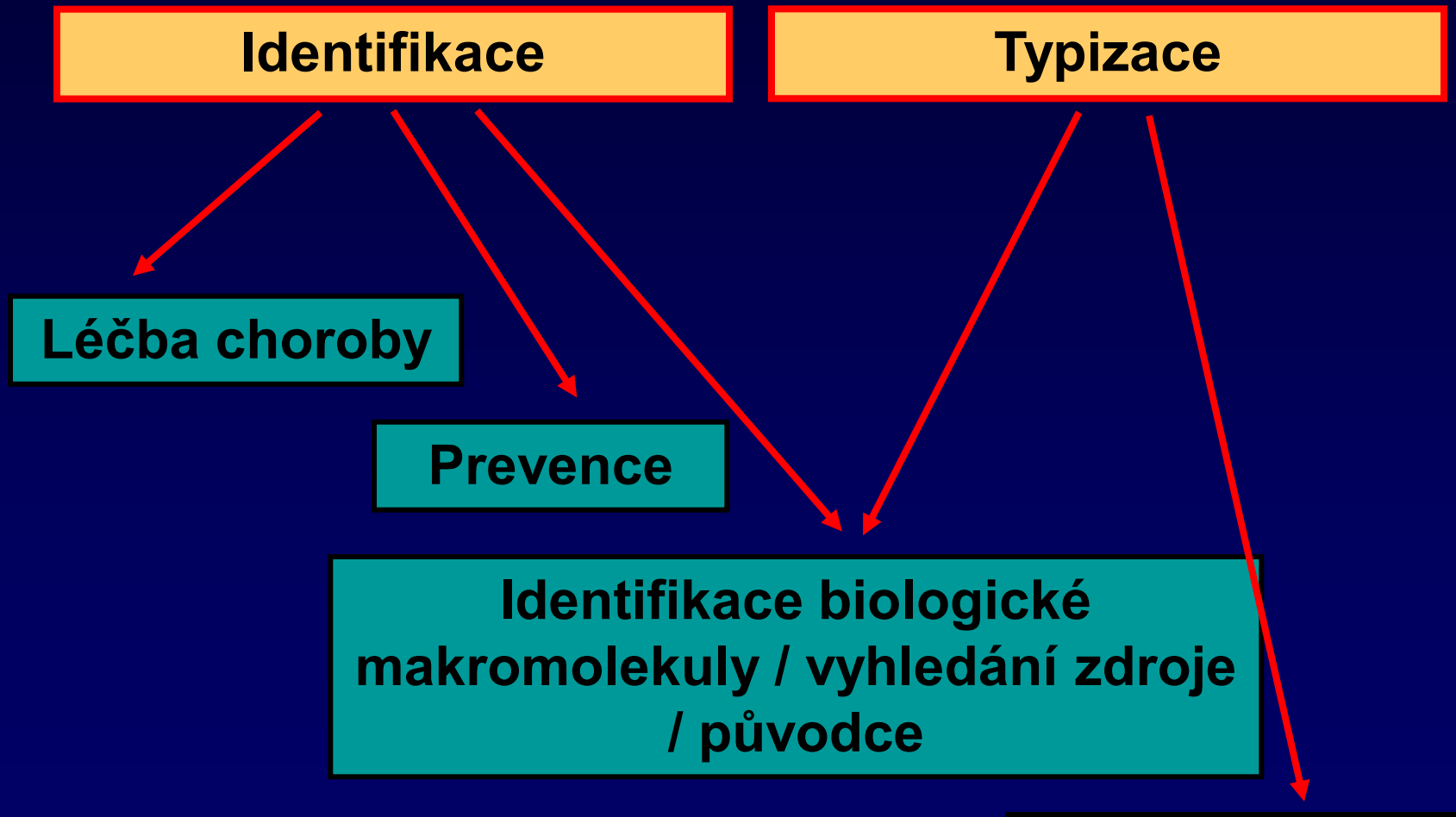
Metody molekulární diagnostiky

Molekulární diagnostika



Genotypové metody

- Výhodou genotypových metod oproti fenotypovým je
  - nezávislost na expresi specifických genů v umělém prostředí (laboratorní média)
  - genotypové znaky jsou na rozdíl od fenotypových (biotyp, sérotyp, antibiogram) relativně stálé
  - dávají reprodukovatelné výsledky analýz i za různých laboratorních podmínek
  - jsou rychlé a zpravidla nevyžadují předchozí kultivaci mikroorganismů
    - identifikace patogenů, které nelze snadno nebo vůbec kultivovat
  - metody založené na chromozomální DNA mají na rozdíl od fenotypových metod 100% typovatelnost, protože všechny baktérie mají chromozóm a proto se tyto metody zaměřují na stupeň a povahu polymorfismů DNA

Metody pro detekci polymorfizmů v genomech

- Přímá metoda:
  - **Sangerovo sekvencování**
  - **sekvenování nové generace**
  - **Jednonukleotidové polymorfizmy detekované pomocí vysoce výkonných metod**
- Nepřímé metody: **fingerprinting** (otisky DNA)
  1. **RFLP** – polymorfizmus délek restrikčních fragmentů
  2. **AFLP** – polymorfizmus délek amplifikovaných fragmentů
  3. **SSLP**– polymorfizmus délek fragmentů s jednoduchou repeticí
  4. **CFLP**– polymorfizmus délek fragmentů vytvořených kleavázou
  5. **SSCP** – polymorfizmus konformace jednořetězců
  6. **DSCP** – polymorfizmus konformace dvouřetězců

Hodnocení kvality typizačního systému

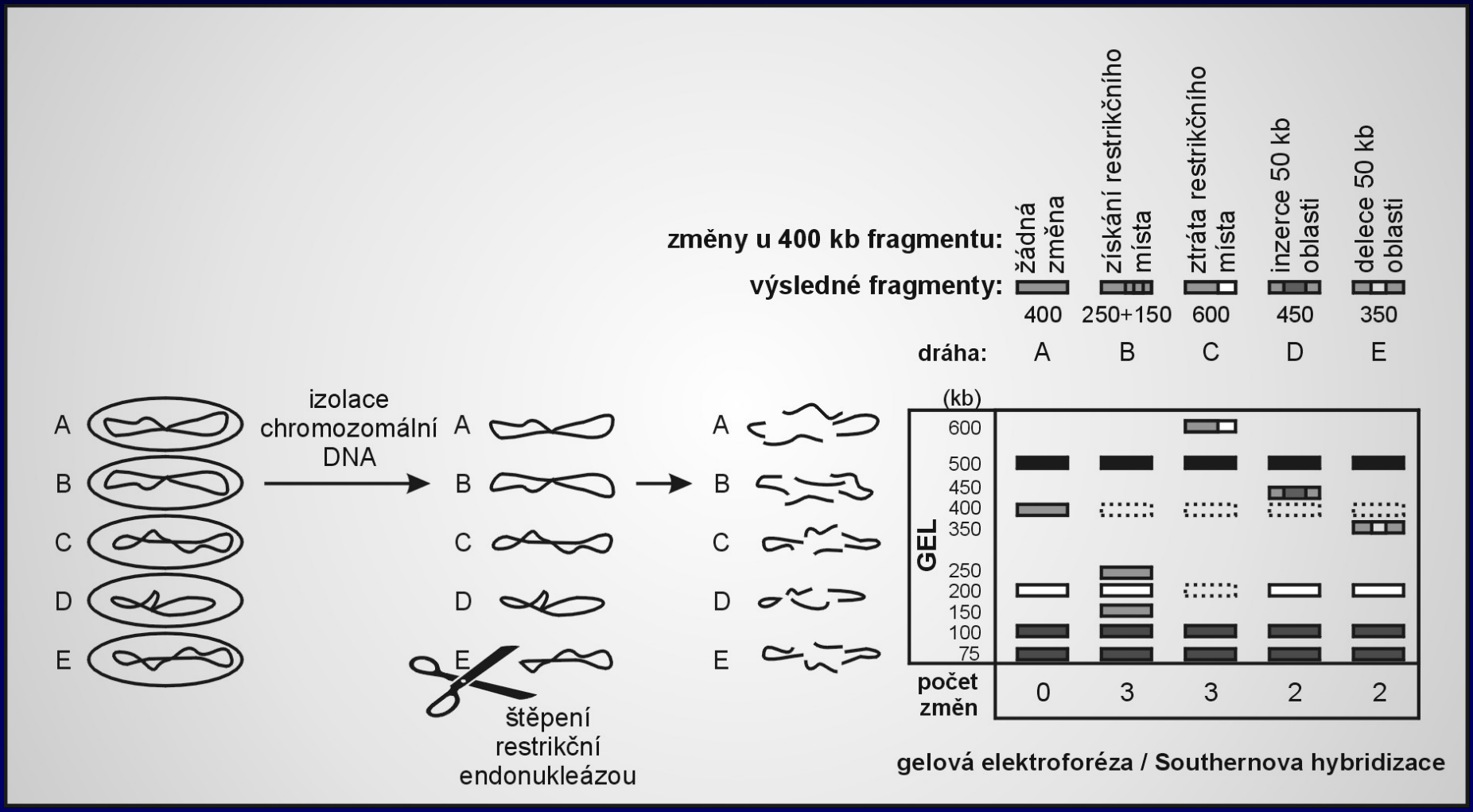
- Každý typizační systém je charakterizován 7 kritériemi (Maslow, 1993)
  - Typovatelnost
  - Reprodukovatelnost
  - Stálost
  - Rozlišovací síla
  - Epidemiologická shoda
  - Snadnost interpretace
  - Jednoduchost provedení

RFLP

Polymorfizmus délky restrikčních fragmentů

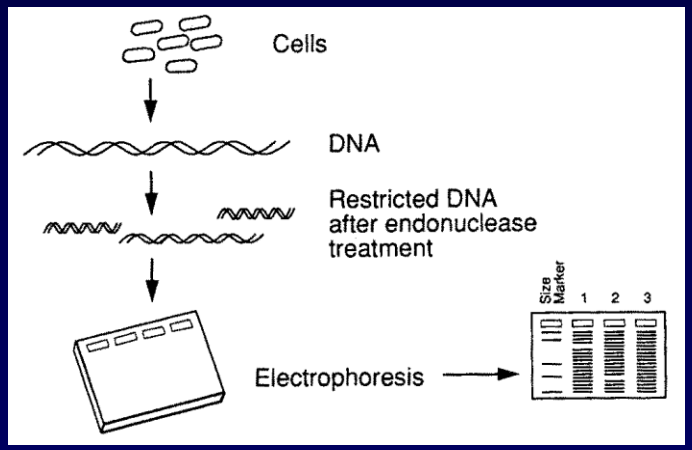
Princip RFLP

RFLP vzniká přestavbami sekvencí
- inzercemi
- delecemi
- substitucemi bazí uvnitř restrikčních míst

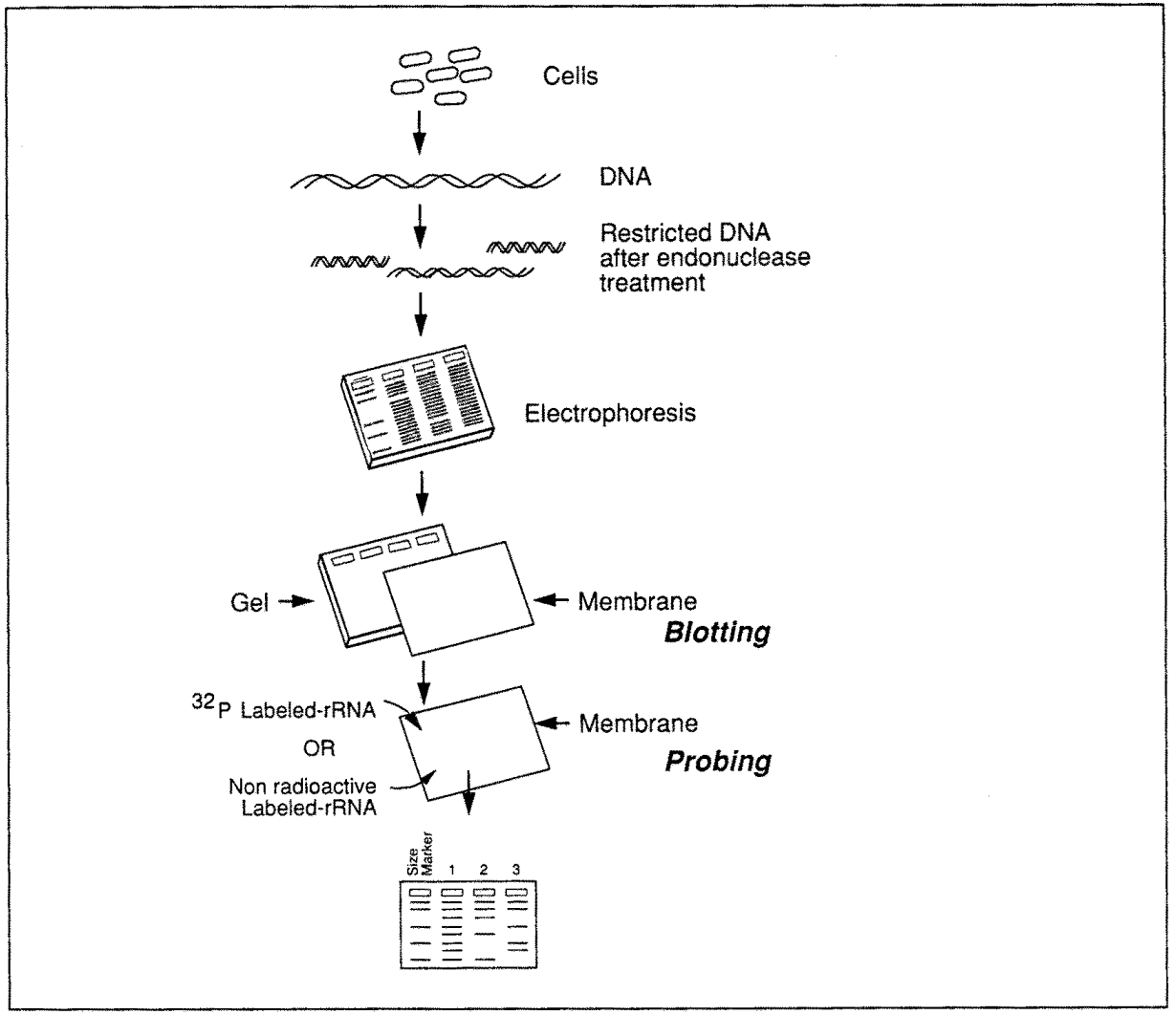


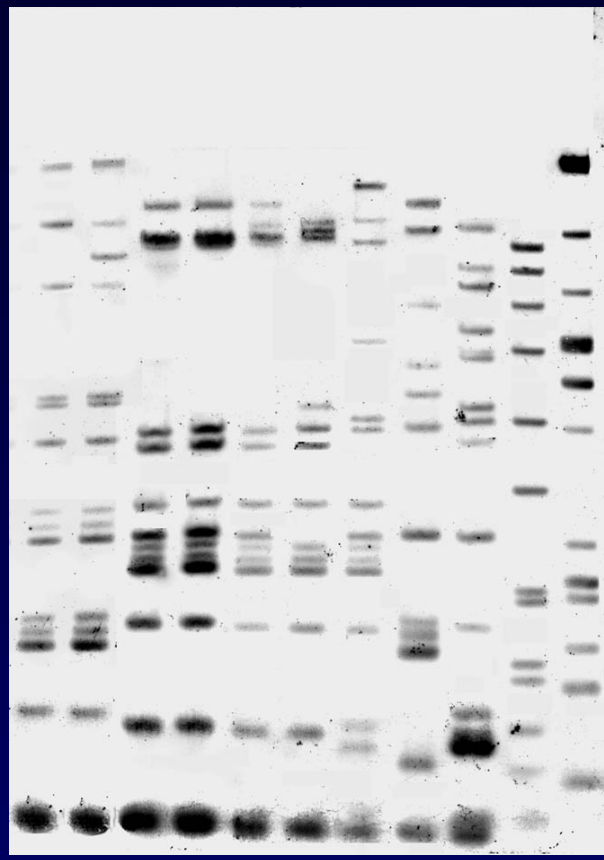
Restrikční analýza chromozomální DNA (REA)

- Jedna z prvních DNA typizačních metod zahrnující analýzu počtu a velikosti restrikčních fragmentů vznikajících štěpením specifickou restrikční endonukleázou (RE).
- Rozdíly mezi fragmenty se označují jako polymorfizmus délek restrikčních fragmentů (RFLP).
- Metoda restrikční analýzy zahrnuje následující kroky:
  - izolace chromozomární DNA
  - výběr vhodné RE
  - štěpení RE
  - elektroforéza DNA fragmentů vizualizace barvením v etidiumbromidu a densitometrické vyhodnocení
  - Hybridizace se sondou a selektivní detekce genu



Princip selektivní hybridizace





Příklad hybridizace se sondou specifickou pro16S rDNA.

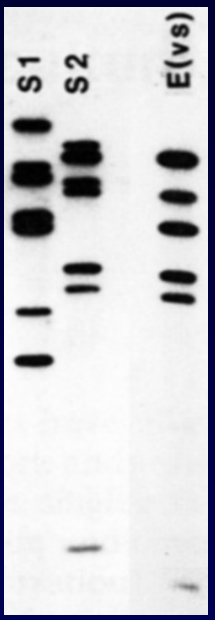
selektivní hybridizace přináší značné zjednodušení při interpretaci spekter fragmentů DNA

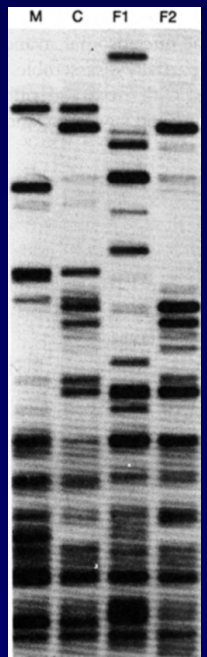
Sondy používané pro SRFH u eukaryot

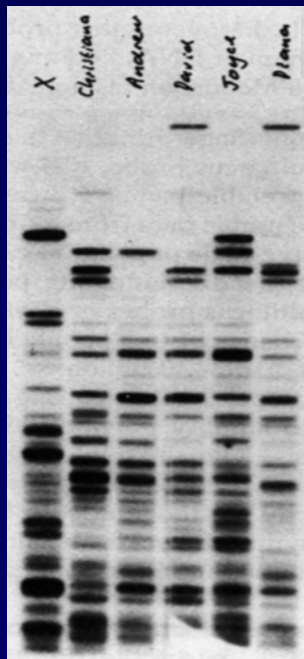
- **Jednolokusové sondy**
  - Hybridizují k jedné hypervariabilní oblasti genomu a vytvářejí vzor o 1-2 proužcích
  - Pro identifikační účely se používá směs („kokteil“) jednolokusových sond
  - Jsou citlivější a dávají jednodušší obraz než multilokusové sondy
  - Pro hybridizaci je třeba min 10 ng DNA
- **Mnoholokusové sondy**
  - Hybridizují k repetitivním sekvencím vyskytujícím se s četností 100 – 1000 v genomu
  - Při Southernově hybridizaci se detekuje 20 – 30 proužků
  - U člověka se využívá minisatelitů, z nichž 60 má společnou konvenční sekvenci
  - Délka repeticí u každé z alel je polymorfní
  - Pravděpodobnost, že 2 jedinci budou mít stejnou délku 1 repetice po štěpení restriktázou *Hinf*I je 0,25. Pokud uvažujeme 36 detekovatelných lokusů (proužků), je pravděpodobnost výskytu stejného vzoru

$$0{,}25^{36}=10^{-22}$$

  - Nevýhodou je vysoký nárok na množství DNA (250 ng)
  - Příklad hybridizace se sondou připravenou z minisatelitu v myoglobinovém genu s konvenční sekvencí GGAGGTGGGCAGGANG

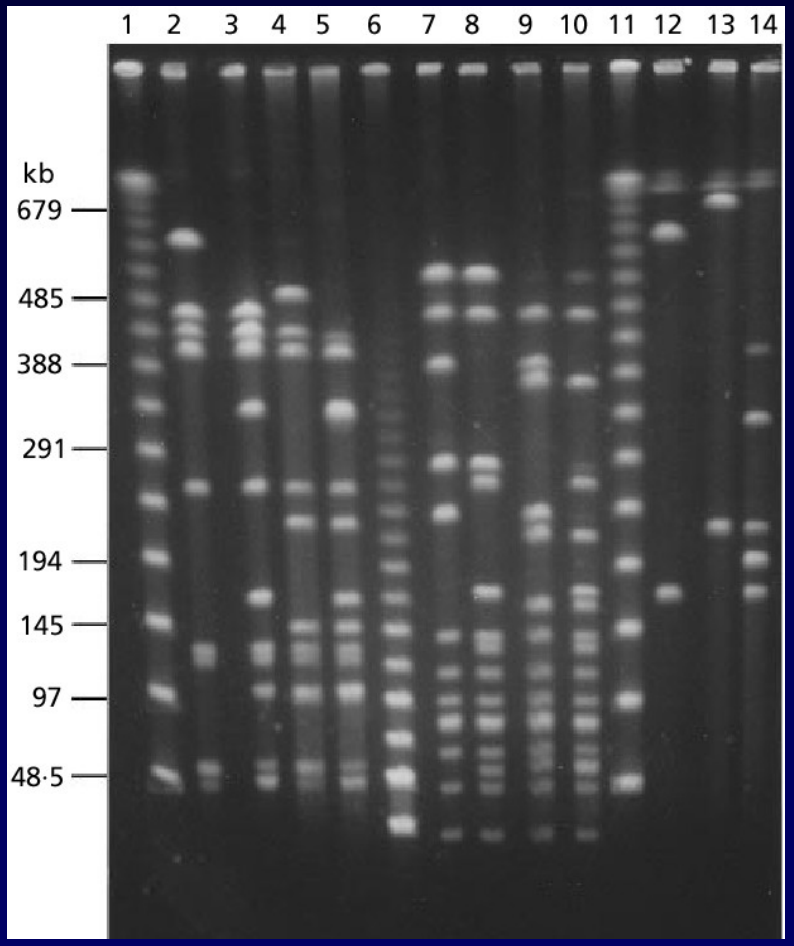






Makrorestrikční analýza chromozomální DNA pomocí PFGE

- Metoda slouží pro stanovení RFLP genomové DNA při použití restrikčních endonukleáz, které štěpí DNA na < 30 místech.
- Vznikají velké fragmenty chromozomální DNA (10 - 1000 kbp), které jsou separovány **pulzní gelovou elektroforézou**.
- Pro izolaci intaktní DNA není vhodná konvenční metoda, ale používá se specifický postup.



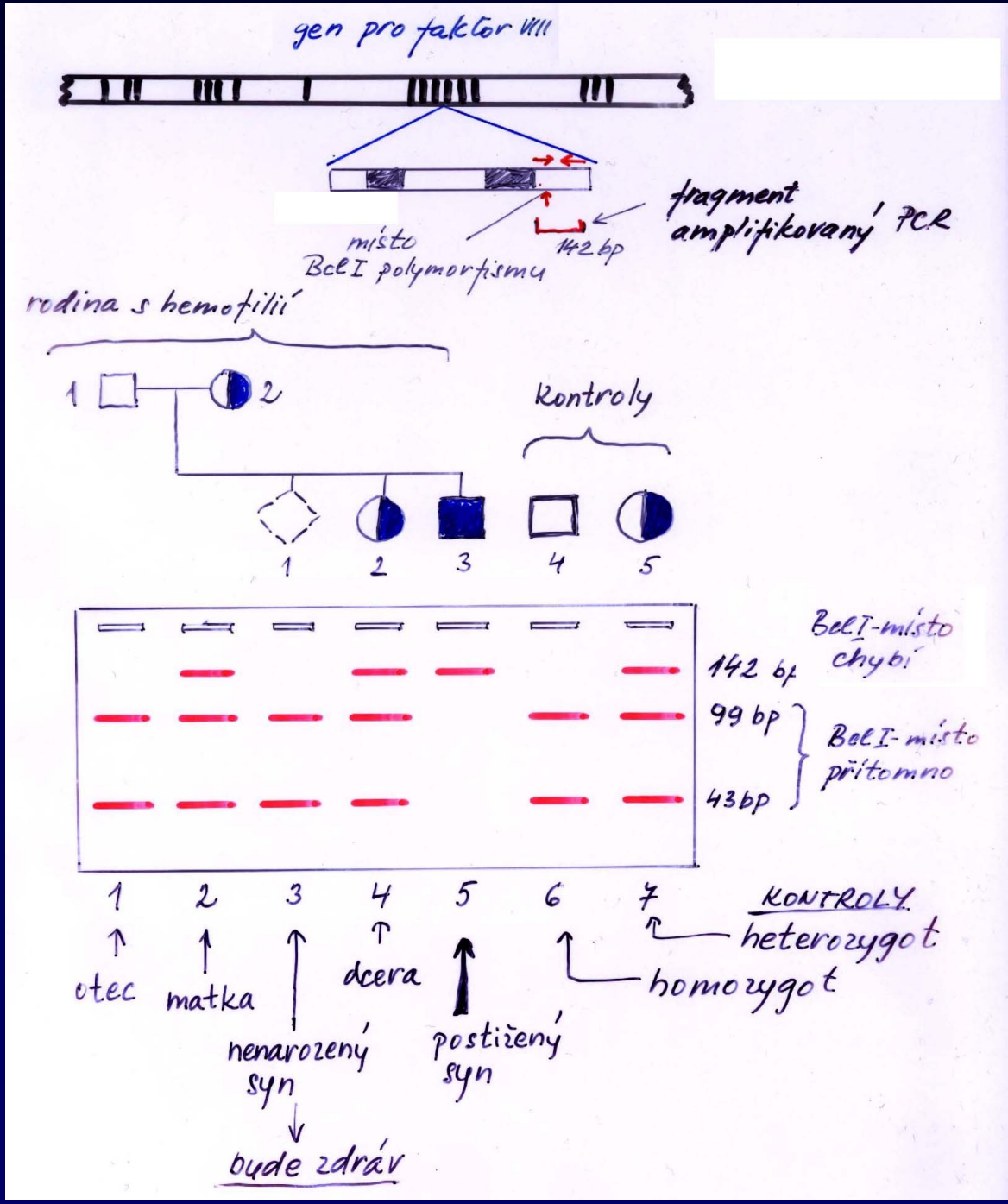
Příklad pulzní gelové elektroforézy DNA různých kmenů *Staphylococcus carnosus*.

PCR-RFLP

Polymorfizmus délky restrikčních fragmentů-selektivní hybridizace restrikčních fragmentů

Prenatální diagnóza hemofilie pomocí PCR-RFLP

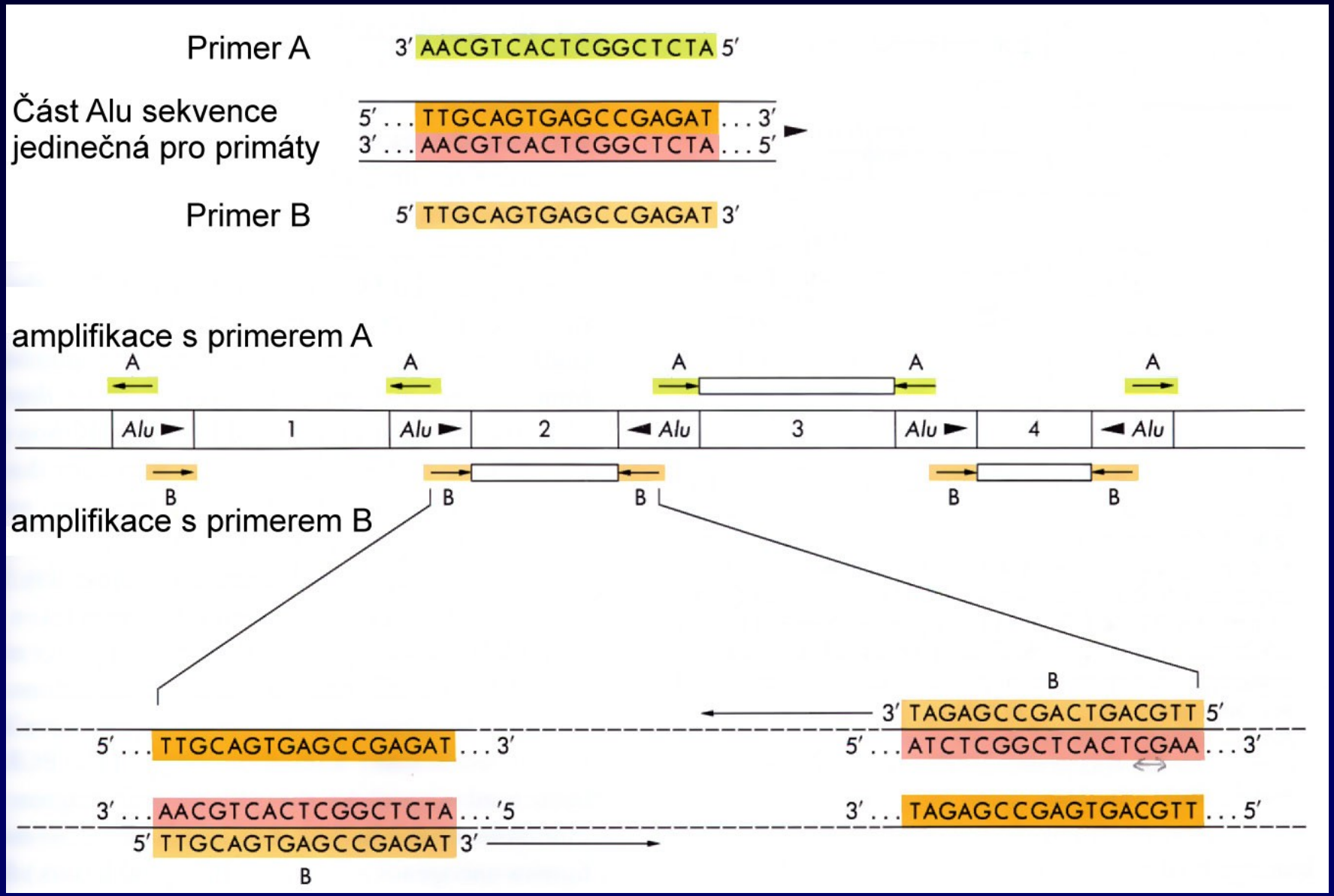
- V analyzované oblasti DNA mohou být až tři místa *Bcl*I, přičemž jedno z těchto míst v intronu 18 je polymorfní.
- Fragment DNA o délce 142 bp obklopující polymorfní místo *Bcl*I je nasyntetizován s pomocí oligonukleotidových primerů.
- Normální alela má *Bcl*I místo a proto je fragment štěpen na 99 + 43 bp fragmenty
- Polymorfní místo může
  - chybět na obou chromozomech (5),
  - přítomné na jednom a chybět u druhého (2,4,7)
  - nebo být přítomné na obou (1,3,6).



AFLP – polymorfizmus délek amplifikovaných fragmentů

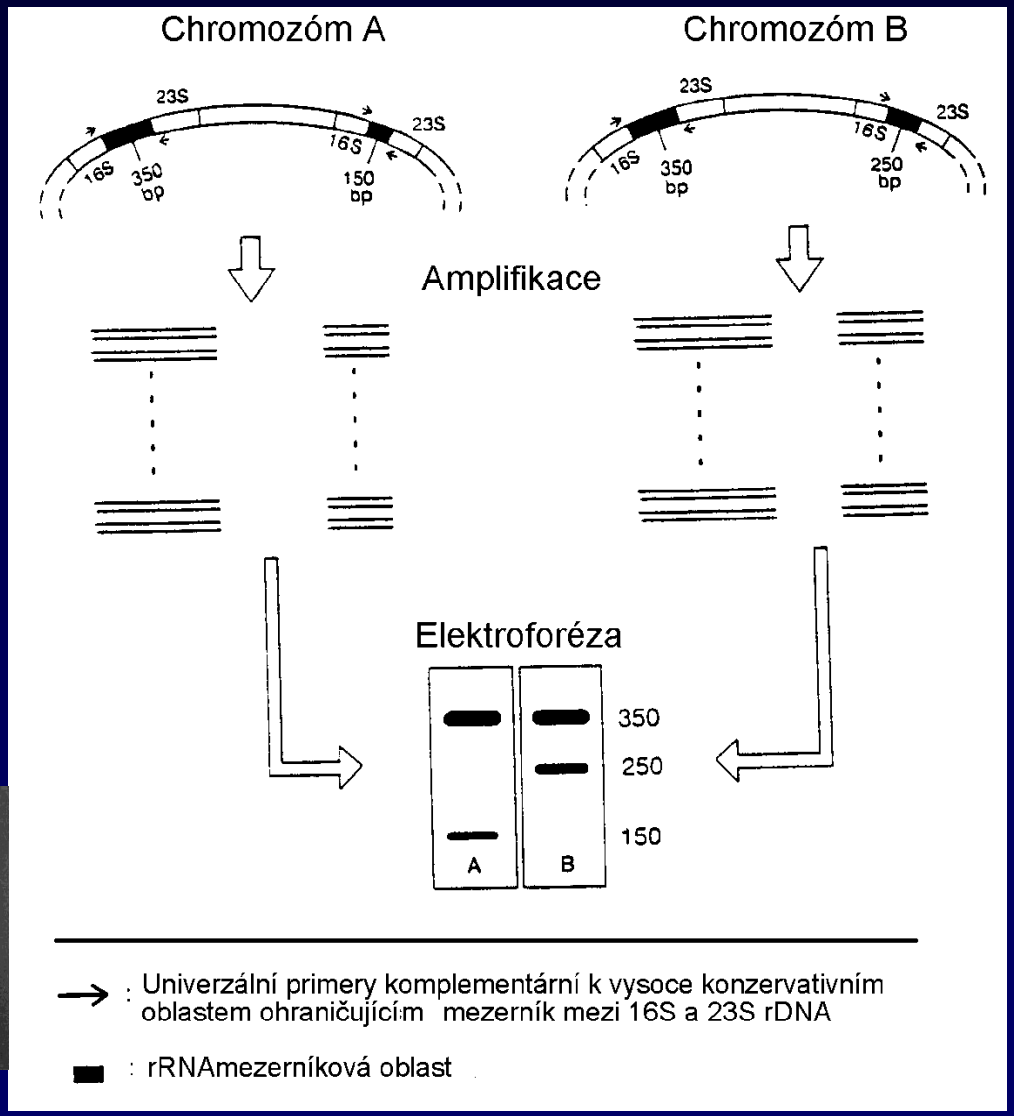
- Jakákoli PCR technika poskytující vznik více než jednoho produktu (fingerprint)
  - AP-PCR (RAPD) – náhodně amplifikovaná DNA
  - Rep-PCR – interrepetitivní PCR
  - Alu-PCR
  - ITS-PCR (RS-PCR) – Amplifikace mezerníků

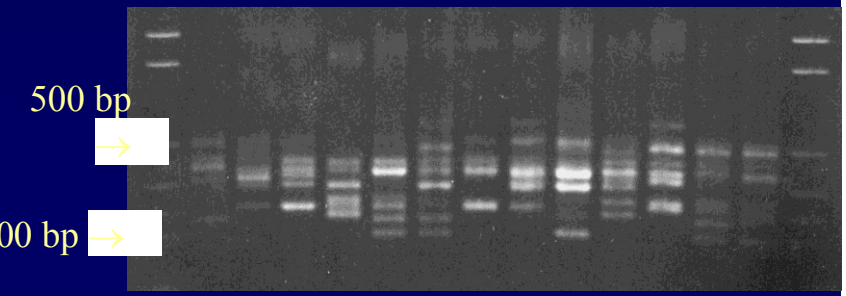
*Alu*I-PCR


Primer A
3′ AACGTCACTCGGCTCTA 5′
Část Alu sekvence jedinečná pro primáty
5′ . . . TTGCAGTGAGCCGAGAT . . . 3′
3′ . . . AACGTCACTCGGCTCTA . . . 5′
Primer B
5′ TTGCAGTGAGCCGAGAT 3′
amplifikace s primerem A
A
Alu
1
2
3
4
B
amplifikace s primerem B
3′ TAGAGCCGACTGACGTT 5′
5′ . . . TTGCAGTGAGCCGAGAT . . . 3′
5′ . . . ATCTCGGCTCACTCGAA . . . 3′
3′ . . . AACGTCACTCGGCTCTA . . . ′5
3′ . . . TAGAGCCGAGTGACGTT . . . 5′
5′ TTGCAGTGAGCCGAGAT 3′

Analýza mezerníkových oblastí v rDNA (RS-PCR, PCR-ribotypizace)

- U prokaryot obsahují rDNA operony geny pro všechny tři typy rRNA (16S, 23S a 5S).
- Geny pro 16S a 23S rRNA jsou odděleny mezerníkovou oblastí, která se liší délkou v závislosti na druhu (od 278 bp u mykobakterií do do 2 kb u borrelií). Navíc u většiny Eubakterií se vyskytuje více kopií rDNA operonu, u nichž se vyskytují menší rozdíly v délce mezerníků.





U *Staphylococcus aureus* se nachází v genomu 6 *rrn* operonů,

SSLP

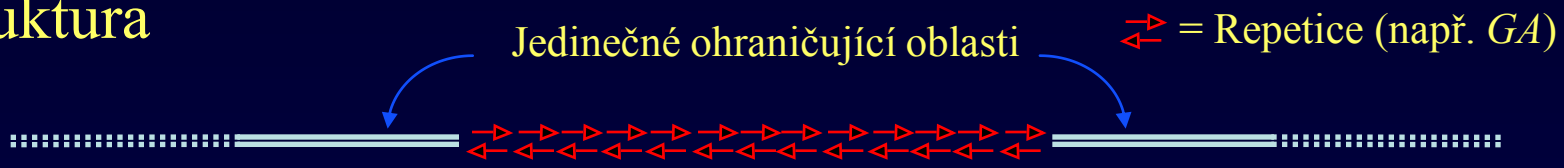
Polymorfizmus délky jednoduchých repetitivních sekvencí

Polymorfizmus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP-PCR)

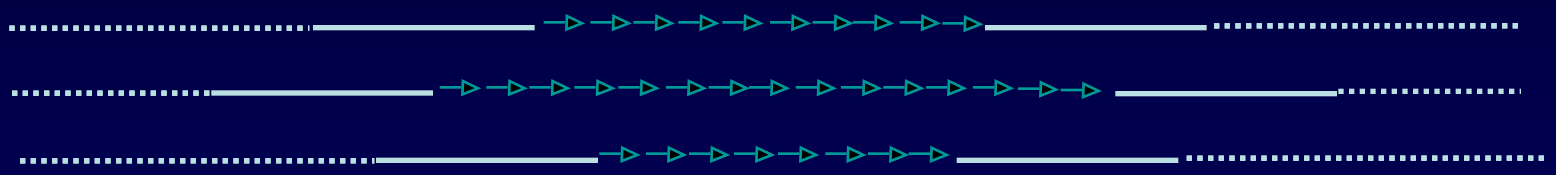
- Jednoduché repetitivní sekvence (SSR) jsou tandemové repetice o délce 2 až 10 bp (např. mikrosatelity) přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80.
- V důsledku mutací nebo rekombinace se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit.
- Primery pro tuto metodu jsou navrhovány tak, aby se připojovaly oblastem ohraničujícím SSR.
  - Tyto ohraničující sekvence bývají konzervativní pouze v rámci druhu a proto je nutné navrhovat pro každý druh novou sadu primerů.
- Jelikož je mezi jedinci počet repeticí značně variabilní, výsledkem amplifikace je vznik různě dlouhých PCR produktů, které jsou separovány na polyakrylamidové nebo agarózové gelové elektroforéze s vysokým rozlišením.
- Rozdílů v délce fragmentů genomové DNA podmíněné přítomností SSR se používá k odlišení blízce příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi zejména v genetice populací.

Příklad amplifikace mikrosatelitů

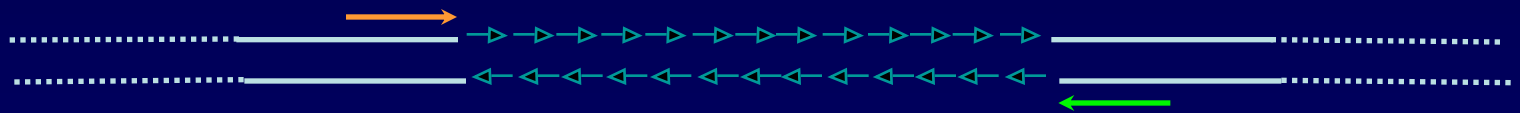
- Struktura



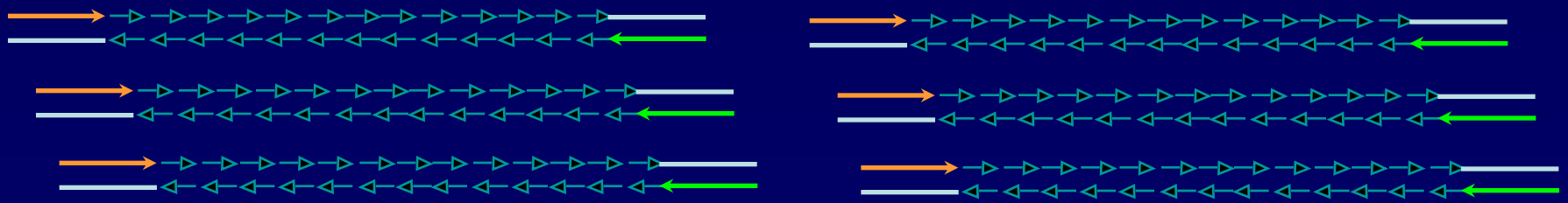
- Počet repeticí je velice variabilní mezi jedinci



Návrh pimerů (⟹) komplementárních k ohraničujícím sekvencím



Amplifikace repeticí pomocí PCR



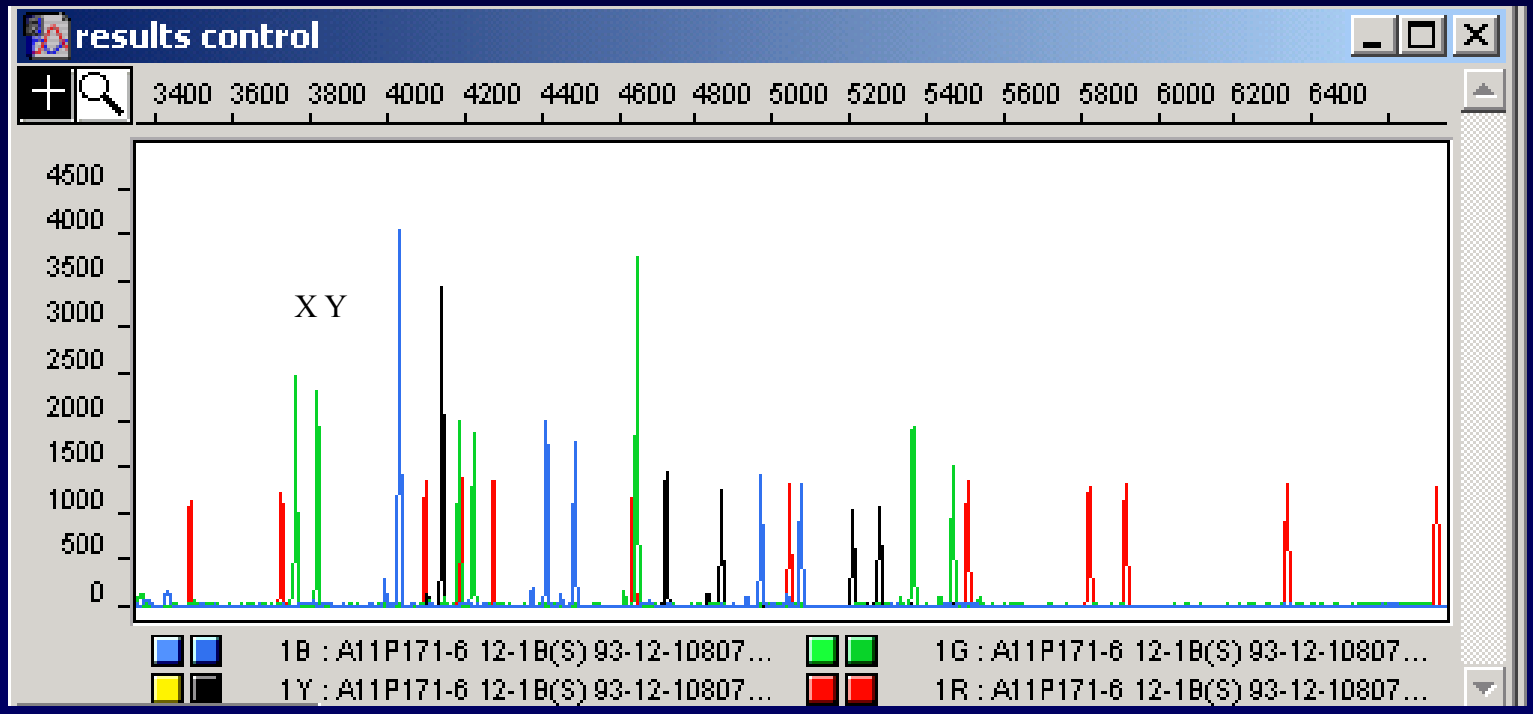
CODIS markery pro identifikaci u člověka

- The official order of the 13 core CODIS loci given within the CODIS system itself is:
  - CSF1PO
  - FGA
  - THO1
  - TPOX
  - VWA
  - D3S1358
  - D5S818
  - D7S820
  - D8S1179
  - D13S317
  - D16S539
  - D18S51
  - D21S11

- Sometimes, the following two loci used more in Europe than America are added to make a standard 15:

  - D2S1338
  - D19S433

Příklad elektroforetogramu s výsledkem multiplex PCR s fluorescenčně značenými primery



Stanovení SSLP na automatickém sekvenátoru

5.
SSCP

Polymorfizmus konformace jednořetězců

SSCP a DSCP: Polymorfizmy detekované speciálními elektroforetickými metodami

- Odhalení lokálních polymorfizmů v DNA je závislé na použití speciálních elektroforetických

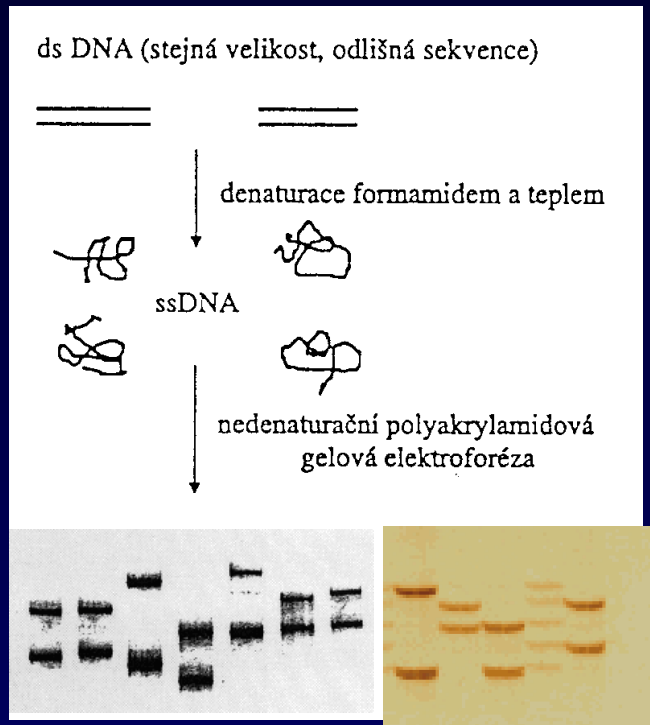
- Metody jsou vhodné zejména pro srovnání polymorfizmu na úrovni genů, aniž by bylo nutné stanovovat přímo jejich sekvenci.

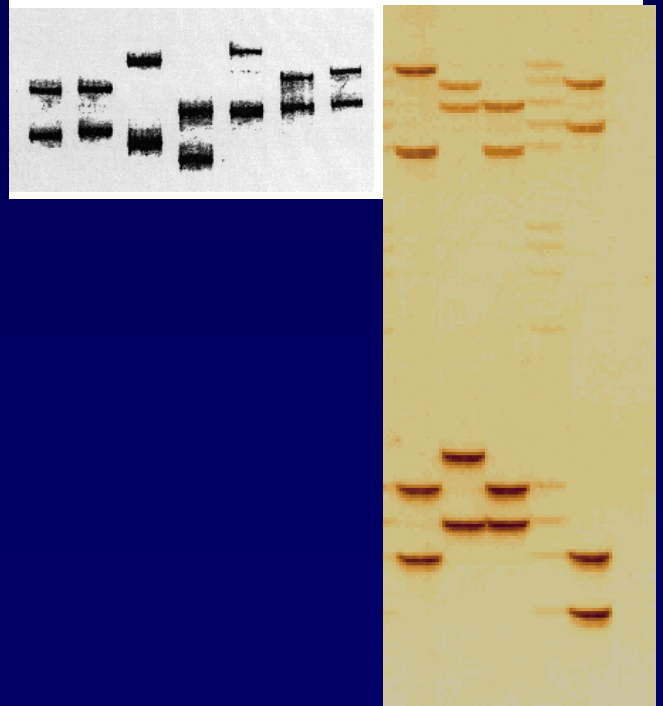
- Úseky DNA s vhodnou velikostí (100 - 2500 bp) se pro analýzy připravují pomocí PCR

Konformační polymorfizmus 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 nedenaturujících 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