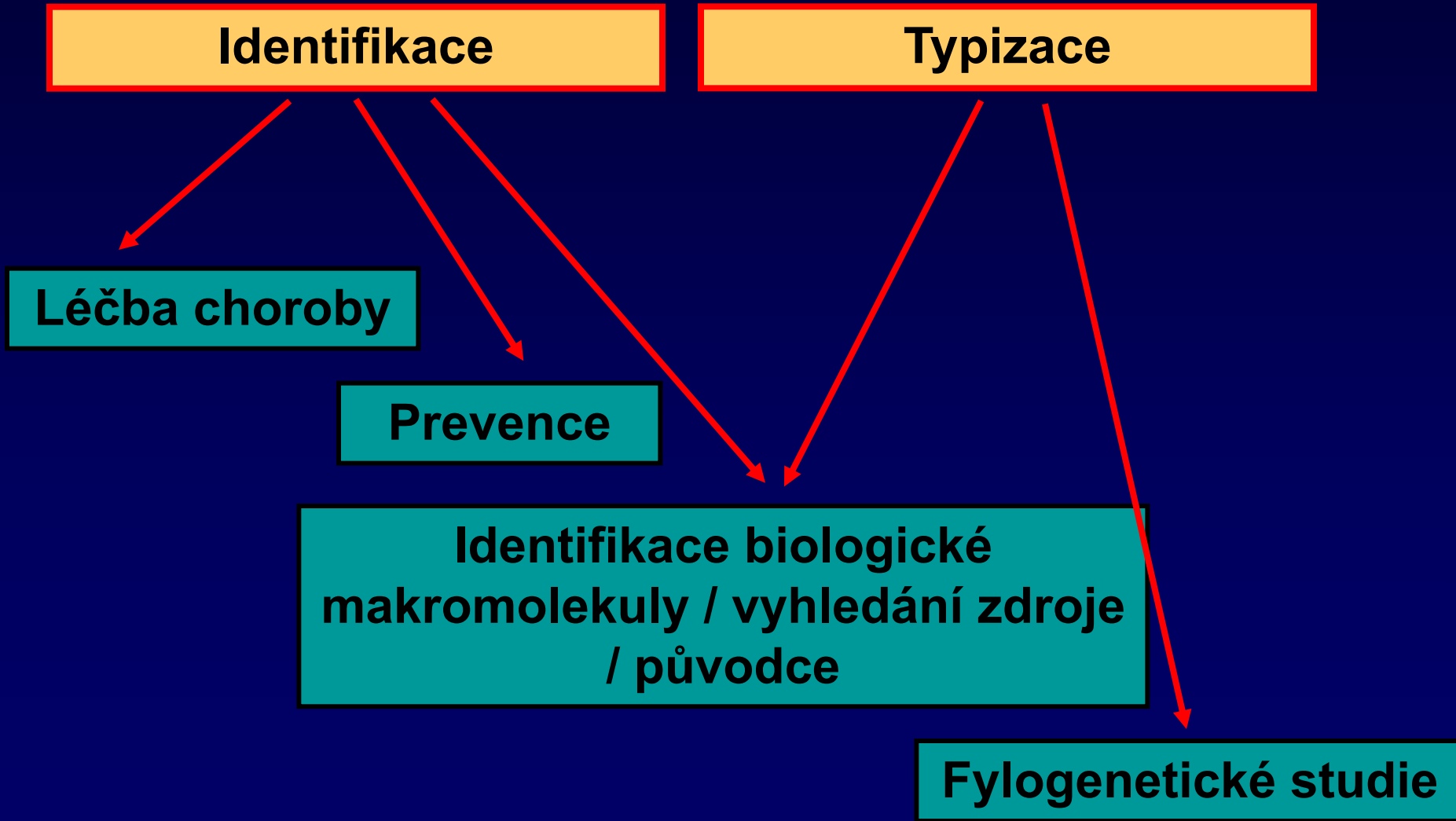


Metody molekulární diagnostiky

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 bakterie mají chromozóm a proto se tyto metody zaměřují na stupeň a povahu polymorfismů DNA

Charakteristika typizačních systémů.

Typizační systém	Typovatelnost (1-2)	Reprodukovatelnost (1-4)	Rozlišovací schopnost (1-5)
FENOTYPOVÉ METODY			
biotypizace	++	+++	+
citlivost k antibiotikům	++	+++	
serotypizace	+	++	+++
fagotypizace	+	+++	+
immoblotting	++	++++	++
multilokusová enzymová elektroforéza	++	++++	++
GENOTYPOVÉ METODY			
analýza plazmidů	+	+++	+++
restrikční analýza (RFLP)	++	++	+++
ribotypizace	++	++++	+++
pulzní elektroforéza (PFGE)	++	+++	++++
PCR-RFLP	++	++++	+++
AP-PCR (RAPD)	++	++	++++
sekvencování	++	++++	++++

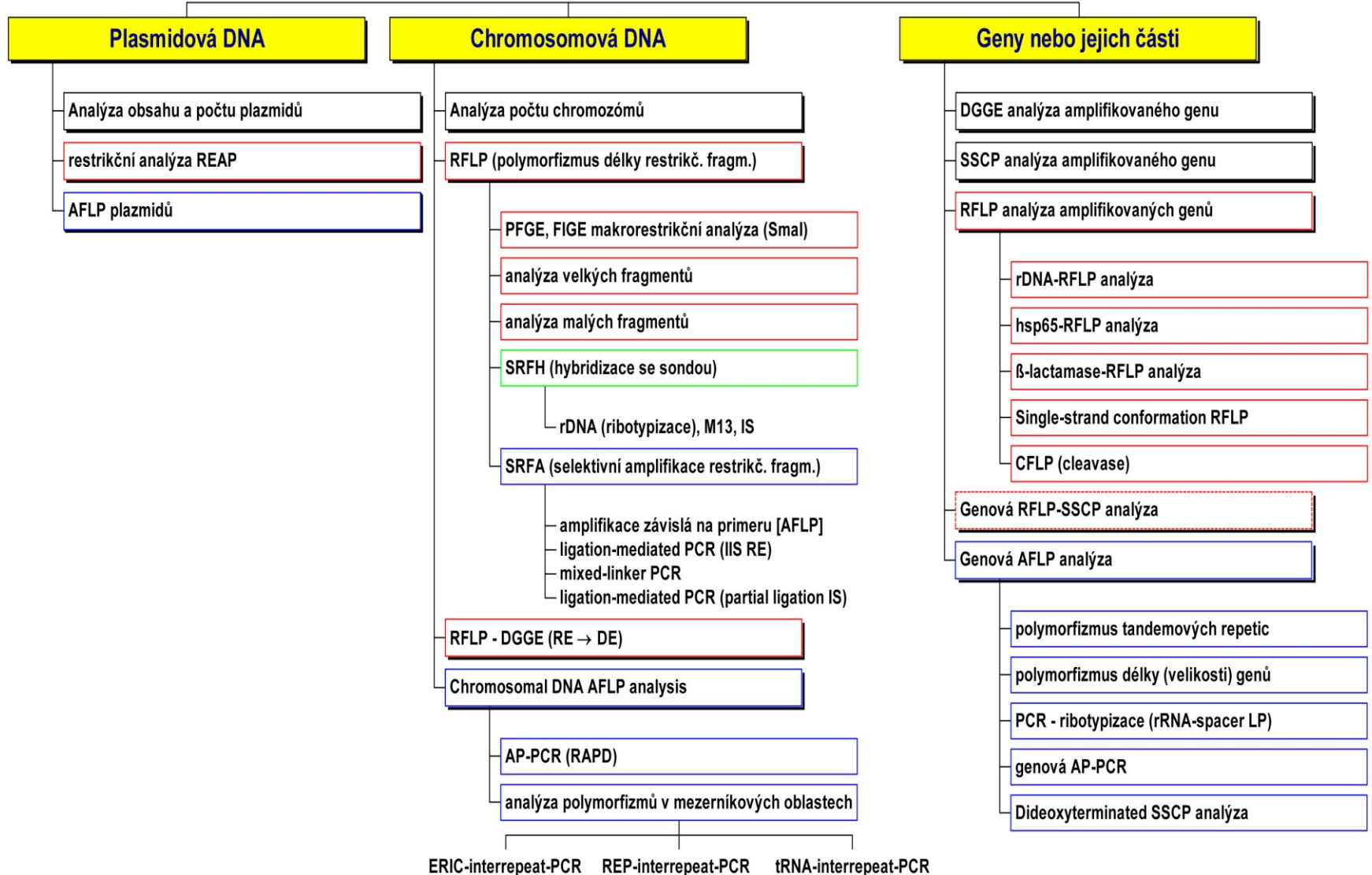
Molekulární metody pro detekci polymorfizmů v genomech

- Cílem je charakterizace
 - Chromozomální DNA
 - Plazmidové DNA
 - Celkové genomové DNA
 - Genů nebo jejich částí
- Posouzení parametrů genomu a výběr relevantních sekvencí pro detekci polymorfizmů
- 2 skupiny metod
 - Přímé
 - Detekce polymorfizmů na úrovni primární struktury (např. sekvencování, real-time PCR pro detekci SNP)
 - Nejpřesnější, ale časově a finančně náročné
 - Nepřímé
 - Poskytují různé typy fingerprintů (otisk DNA) dostupných ve formě obrazů gelu nebo hybridizačních membrán
 - Rozdělují se na techniky
 - bez amplifikace DNA
 - s amplifikací DNA
 - Identifikace konformačních polymorfizmů nukleových kyselin

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** – polymorfismus délek restričních fragmentů
 2. **AFLP** – polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů
 3. **SSLP** – polymorfismus délek fragmentů s jednoduchou repeticí
 4. **SSCP** – polymorfismus konformace jednořetězců

Klasifikace technik pro fingerprinting DNA prokaryot



Hodnocení kvality typizačního systému

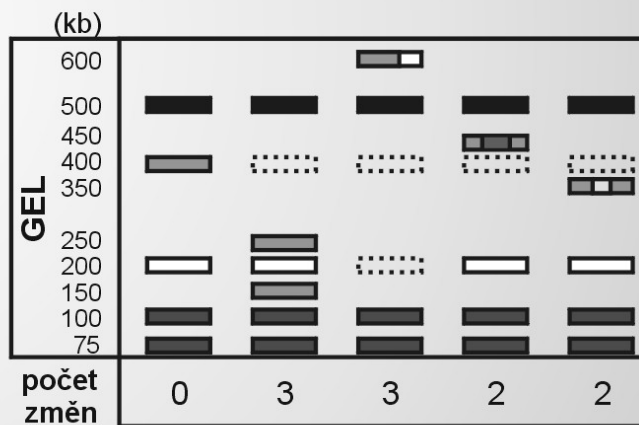
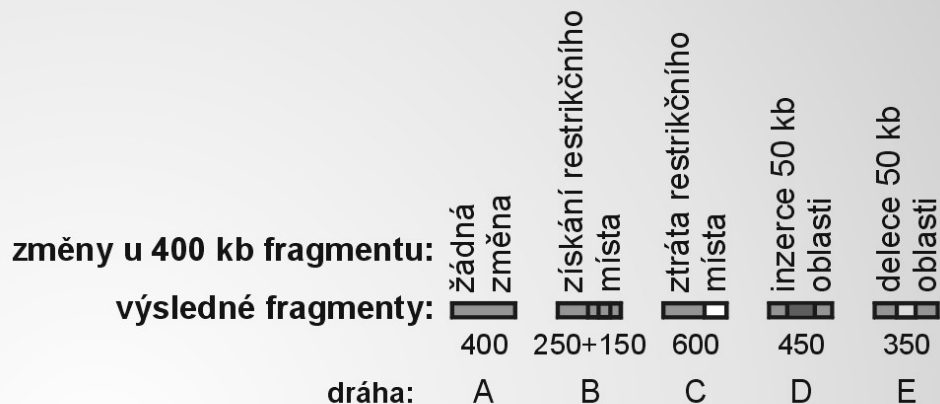
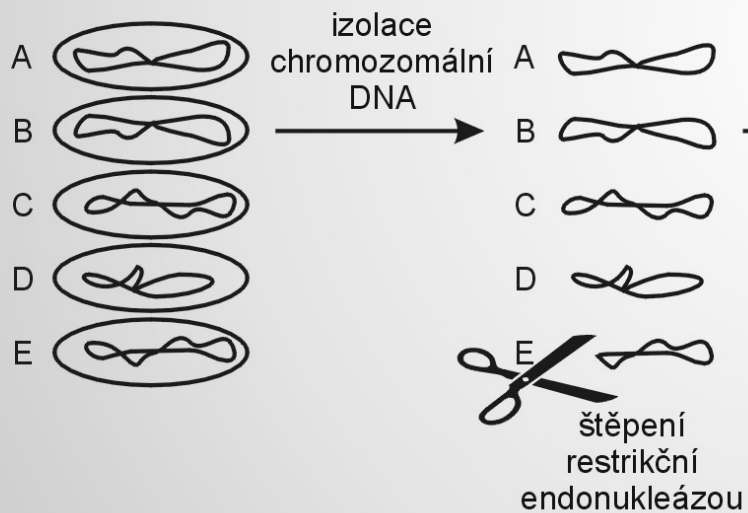
- Každý typizační systém je charakterizován 7 kritériemi (Maslow, 1993)
 - Typovatelnost
 - Reprodukovatelnost
 - Stálost
 - Rozlišovací síla
 - Epidemiologická shoda
 - Snadnost interpretace
 - Jednoduchost provedení

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism

Polymorfizmus délky
restrikčních fragmentů

Princip RFLP

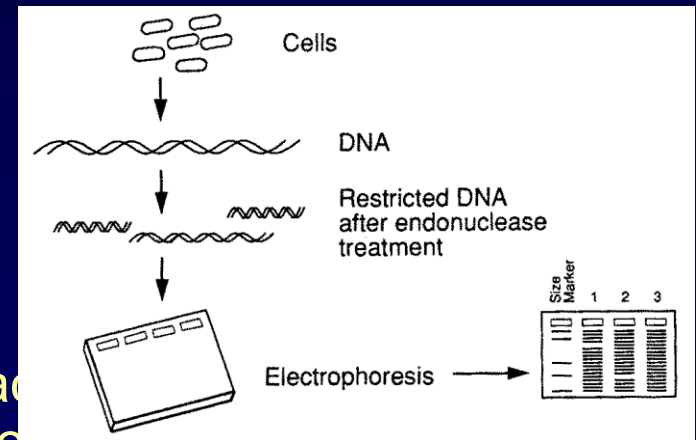
RFLP vzniká přestavbami sekvencí
 inzercemi
 delecemi
 substitucemi bazí uvnitř restrikčních míst



gelová elektroforéza / Southernova hybridizace

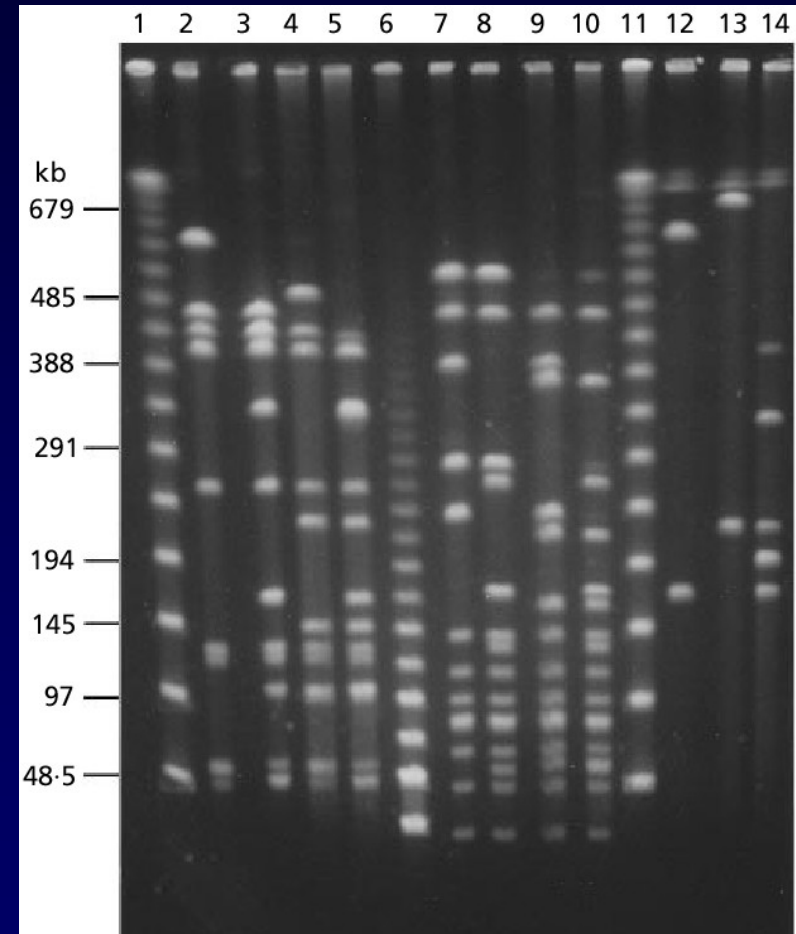
Restrikční analýza chromozomální DNA (REA)

- 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 polymorfismus délek restrikčních fragmentů (RFLP).
- Metoda restrikční analýzy zahrnuje následující kroky:
 - izolace chromozomální DNA
 - výběr vhodné RE
 - štěpení RE
 - elektroforéza DNA fragmentů vizualizace etidiumbromidem a densitometrické vyhodnocení
 - může být proveden na celkové DNA nebo pouze genech nebo jejich částech
 - alternativa: hybridizace se sondou a selektivní detekce genu



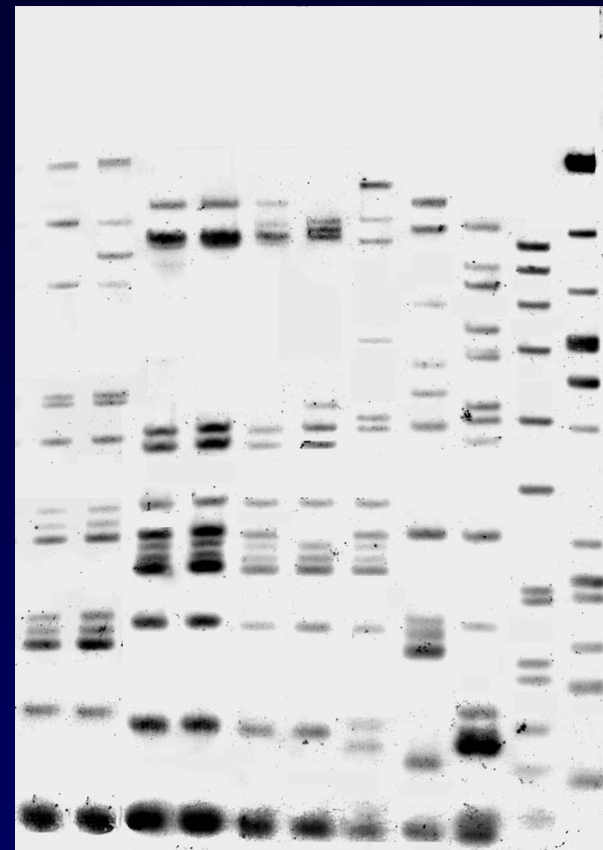
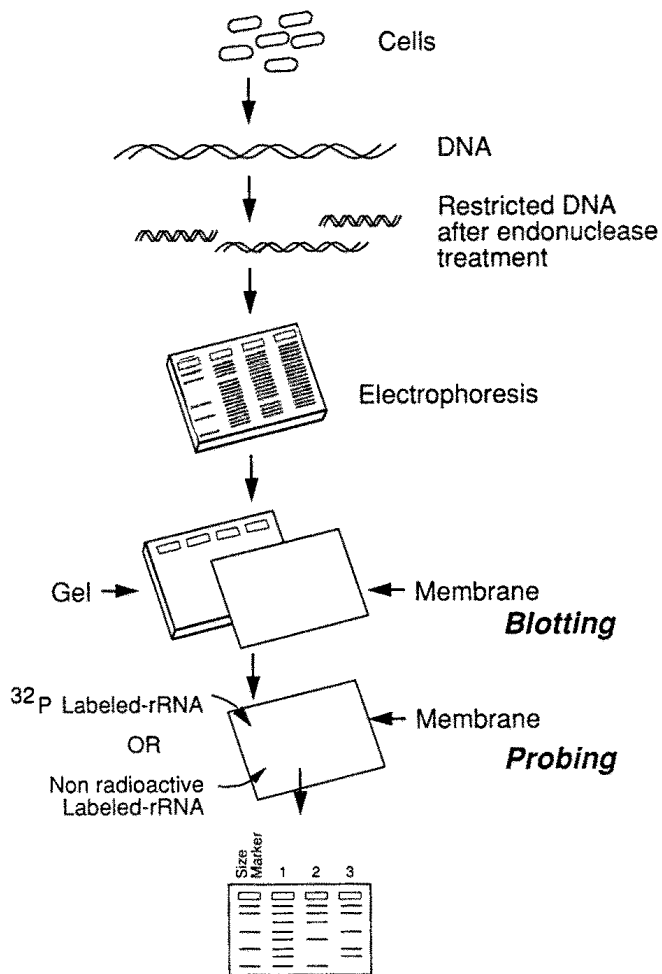
Makrorestrikční analýza chromozomální DNA pomocí PFGE

- Metoda slouží pro stanovení RFLP genomové DNA při použití restričních 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*.

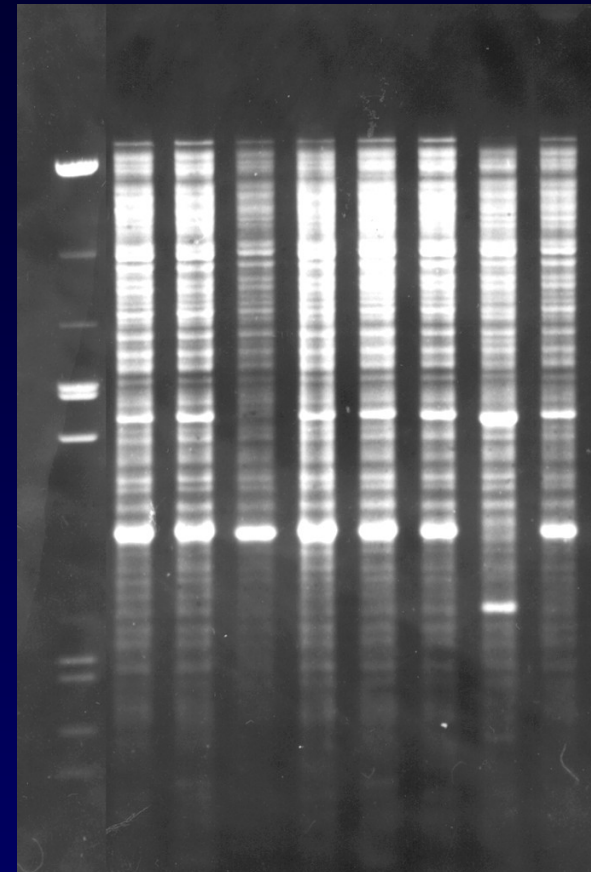
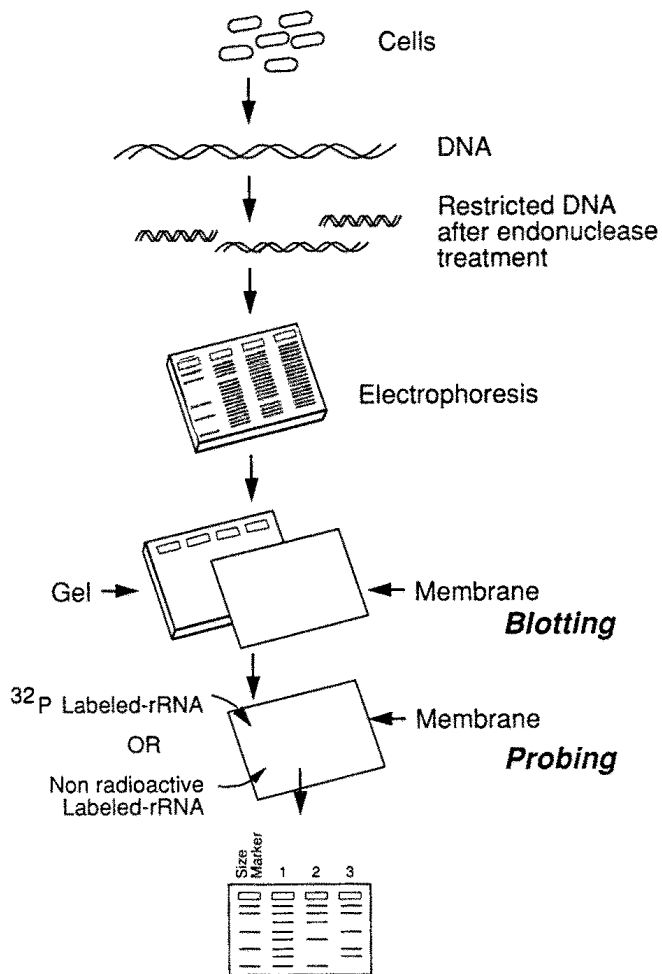
Princip selektivní hybridizace



Příklad hybridizace se sondou specifickou pro 16S rDNA.

selektivní hybridizace přináší značné zjednodušení při interpretaci spekter fragmentů DNA

Princip selektivní hybridizace



Příklad hybridizace se sondou specifickou pro 16S rDNA.

selektivní hybridizace přináší značné zjednodušení při interpretaci spekter fragmentů DNA

Sondy používané pro SRFH u eukaryot

• Jednolokusové sondy

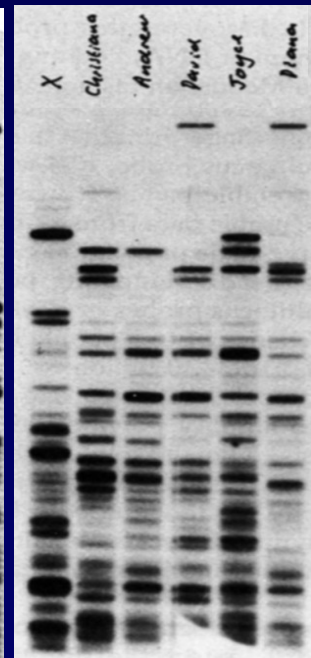
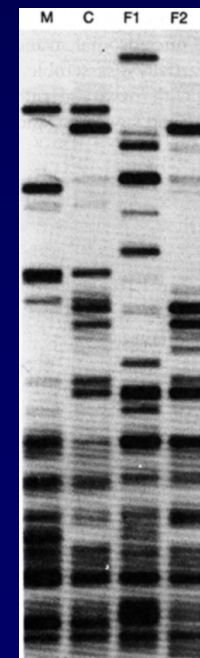
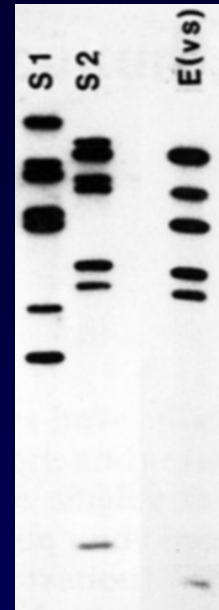
- Hybridizují k jedné hypervariabilní oblasti genomu a vytvářejí vzor o 1-2 proužcích
- Pro identifikační účely se používá směs („koktejl“) jednolokusových sond
- Jsou citlivější a dávají jednodušší obraz než multilokusové sondy
- Pro hybridizaci je třeba min 10 ng DNA

• 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

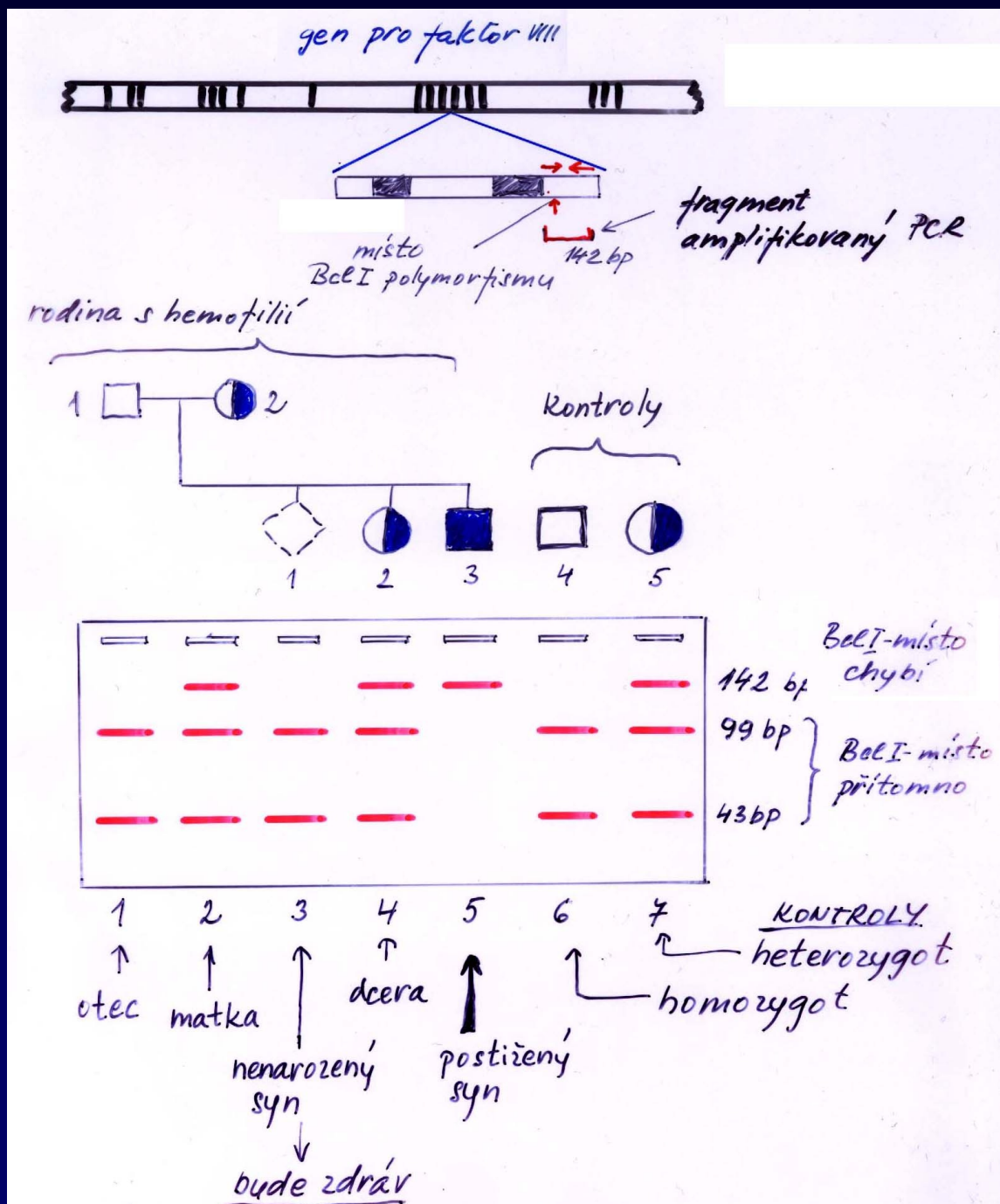
$$0,25^{36}=10^{-22}$$

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



Prenatální diagnóza hemofilie pomocí PCR-RFLP

- V analyzované oblasti DNA mohou být až tři místa *BclI*, přičemž jedno z těchto míst v intronu 18 je polymorfní.
- Fragment DNA o délce 142 bp obklopující polymorfní místo *BclI* je nasyntetizován s pomocí oligonukleotidových primerů.
- Normální alela má *BclI* 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 – Amplified Fragment Length Polymorphism

polymorfizmus délek amplifikovaných fragmentů

- Jakákoli PCR technika poskytující vznik více než jednoho produktu (fingerprint)
 - AP-PCR (RAPD) – náhodně amplifikovaná DNA
 - Rep-PCR – interrepetitivní PCR, primery odvozeny z vícekopiových repetitivních motivů
 - Alu-PCR
 - ITS-PCR (RS-PCR) – Amplifikace mezerníků v genech pro funkční RNA

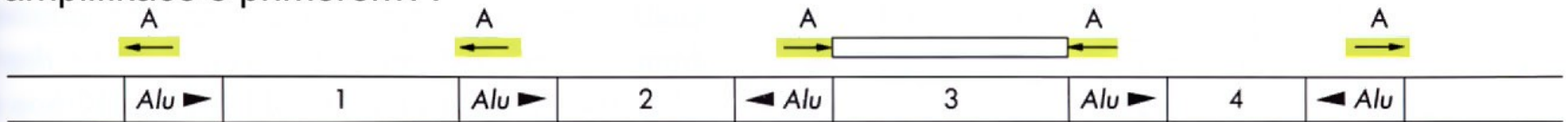
Alu-PCR

Primer A 3' AACGTCACTCGGCTCTA 5'

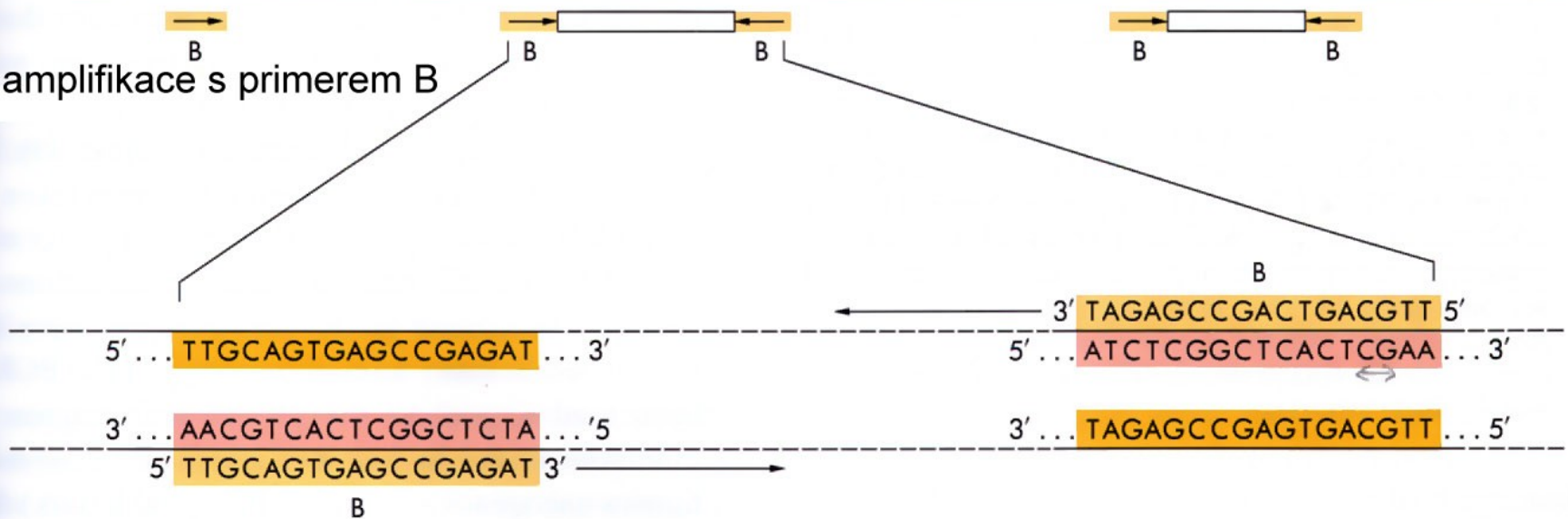
Část Alu sekvence
jedinečná pro primáty
5' ... TTGCAGTGAGCCGAGAT ... 3'
3' ... AACGTCACTCGGCTCTA ... 5'

Primer B 5' TTGCAGTGAGCCGAGAT 3'

amplifikace s primerem A

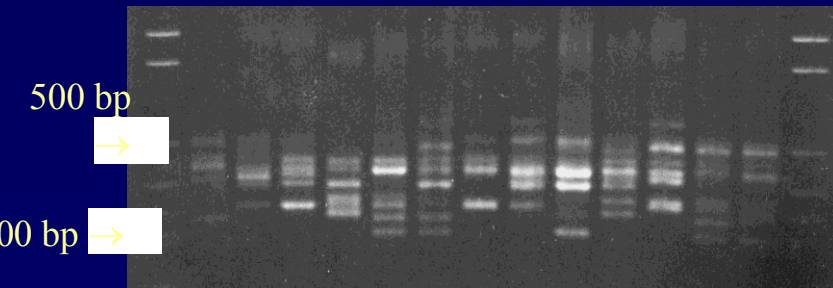
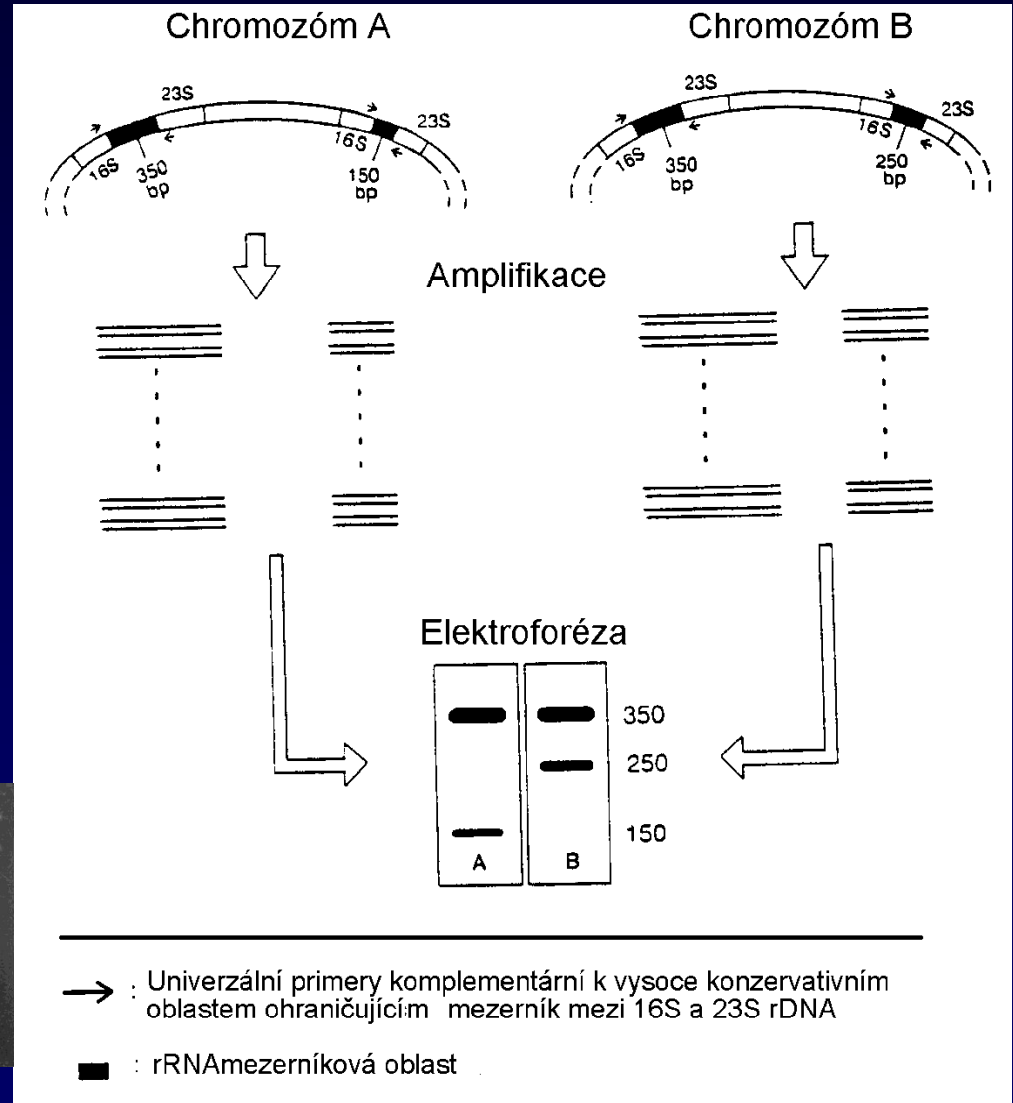


amplifikace s primerem B



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 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 - Simple Sequence Length Polymorphism

Polymorfizmus délky jednoduchých
repetitivních sekvencí

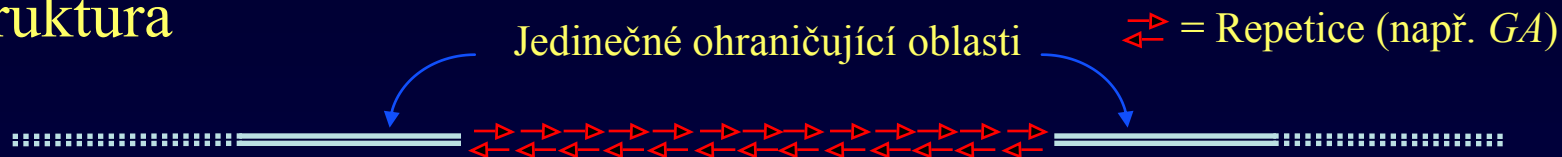
VNTR – Variable Number of Tandem
Repeats

Polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP-PCR)

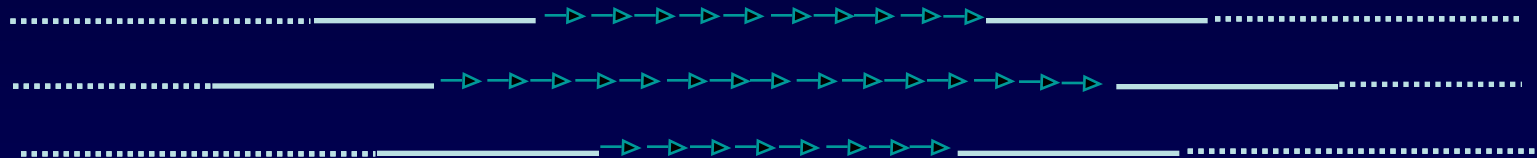
- Jednoduché repetitivní sekvence (SSR) jsou tandemové repetice o délce 2 až 10 bp (např. mikrosatelity) přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80.
- V důsledku mutací nebo rekombinace se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit.
- Primery pro tuto metodu jsou navrhovány tak, aby se připojovaly 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

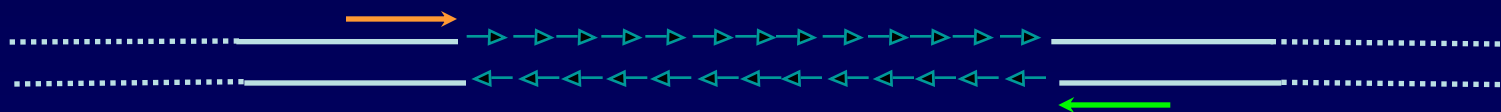
➤ Struktura



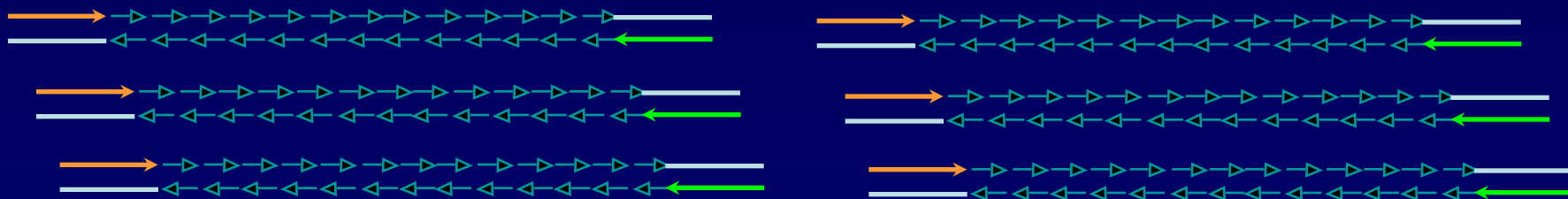
➤ Počet repeticí je velice variabilní mezi jedinci



Návrh primerů (↔) komplementárních k ohraničujícím sekvencím



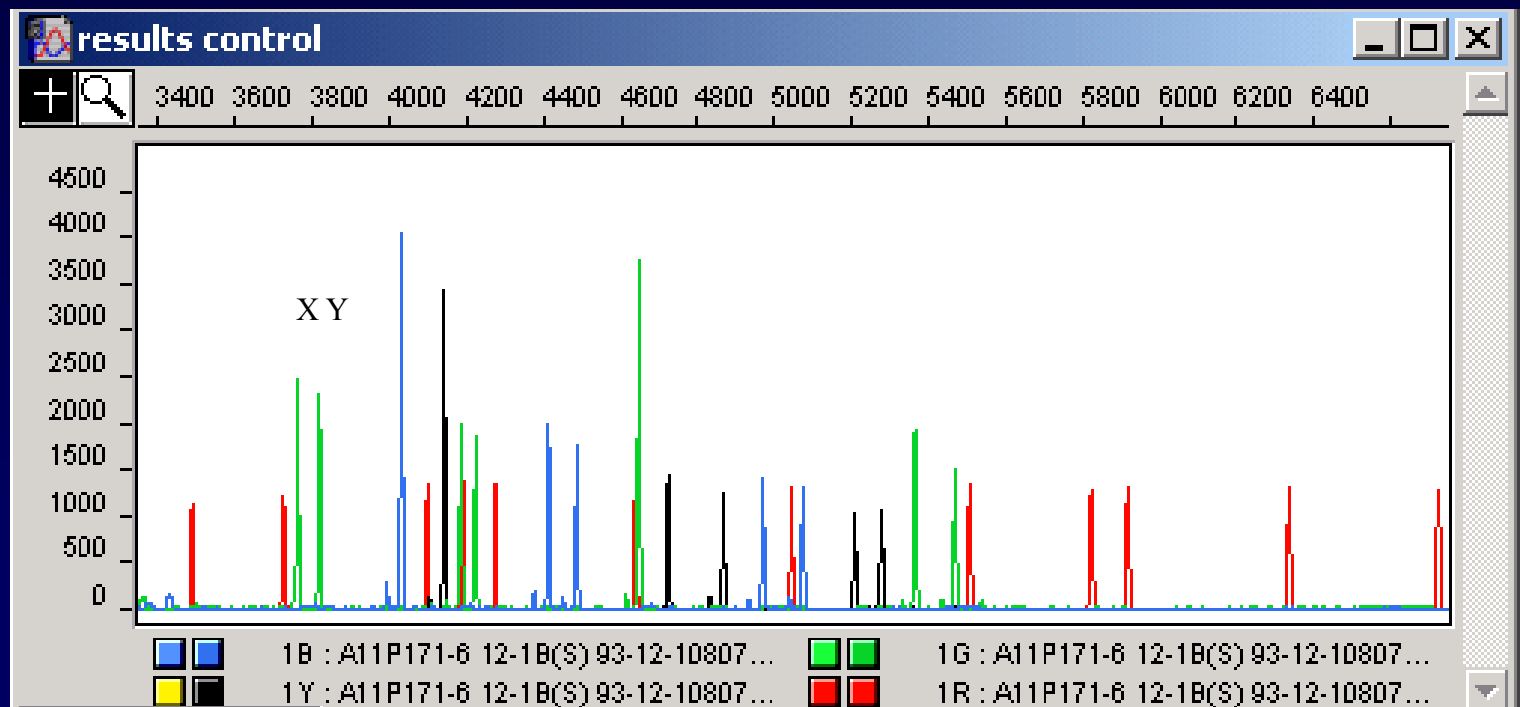
Amplifikace repeticí pomocí PCR



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 - Single Strand
Conformation Polymorphism**

Polymorfizmus konformace
jednořetězců

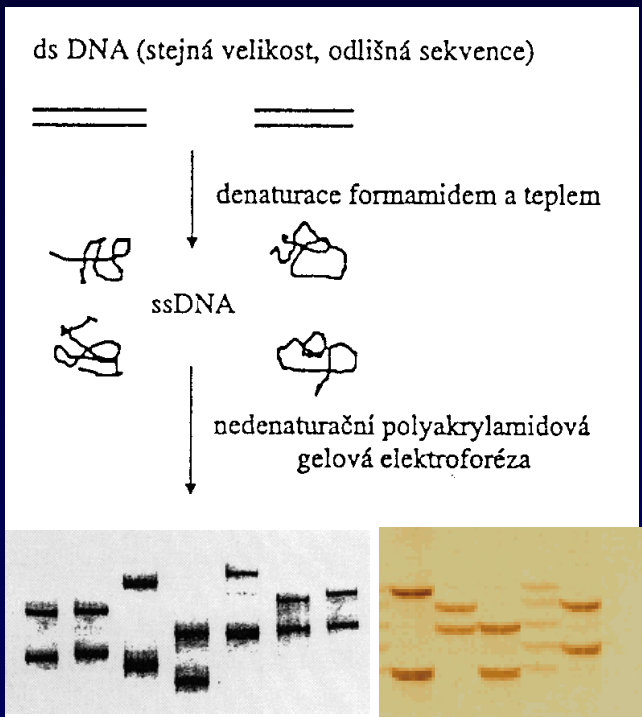
SSCP a DSCP: Polymorfizmy detekované speciálními elektroforetickými metodami

- 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 polymorfismus 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 nedenedaturujících 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