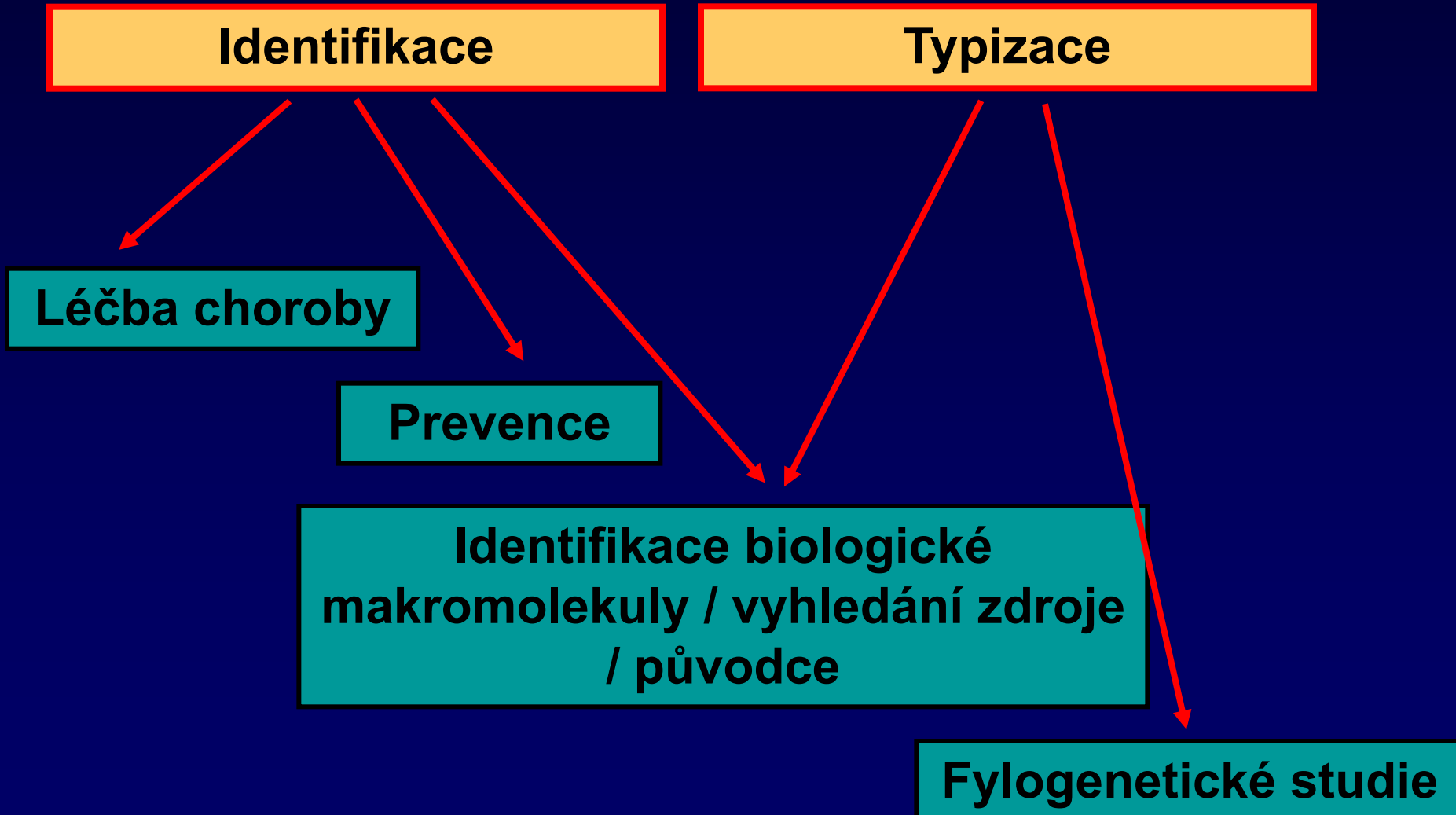


# Metody molekulární diagnostiky

# 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)
<b>FENOTYPOVÉ METODY</b>			
biotypizace	++	+++	+
citlivost k antibiotikům	++	+++	
serotypizace	+	++	+++
fagotypizace	+	+++	+
immoblotting	++	++++	++
multilokusová enzymová elektroforéza	++	++++	++
<b>GENOTYPOVÉ METODY</b>			
analýza plazmidů	+	+++	+++
restrikční analýza (RFLP)	++	++	+++
ribotypizace	++	++++	+++
pulzní elektroforéza (PFGE)	++	+++	++++
PCR-RFLP	++	++++	+++
AP-PCR (RAPD)	++	++	++++
sekvencování	++	++++	++++

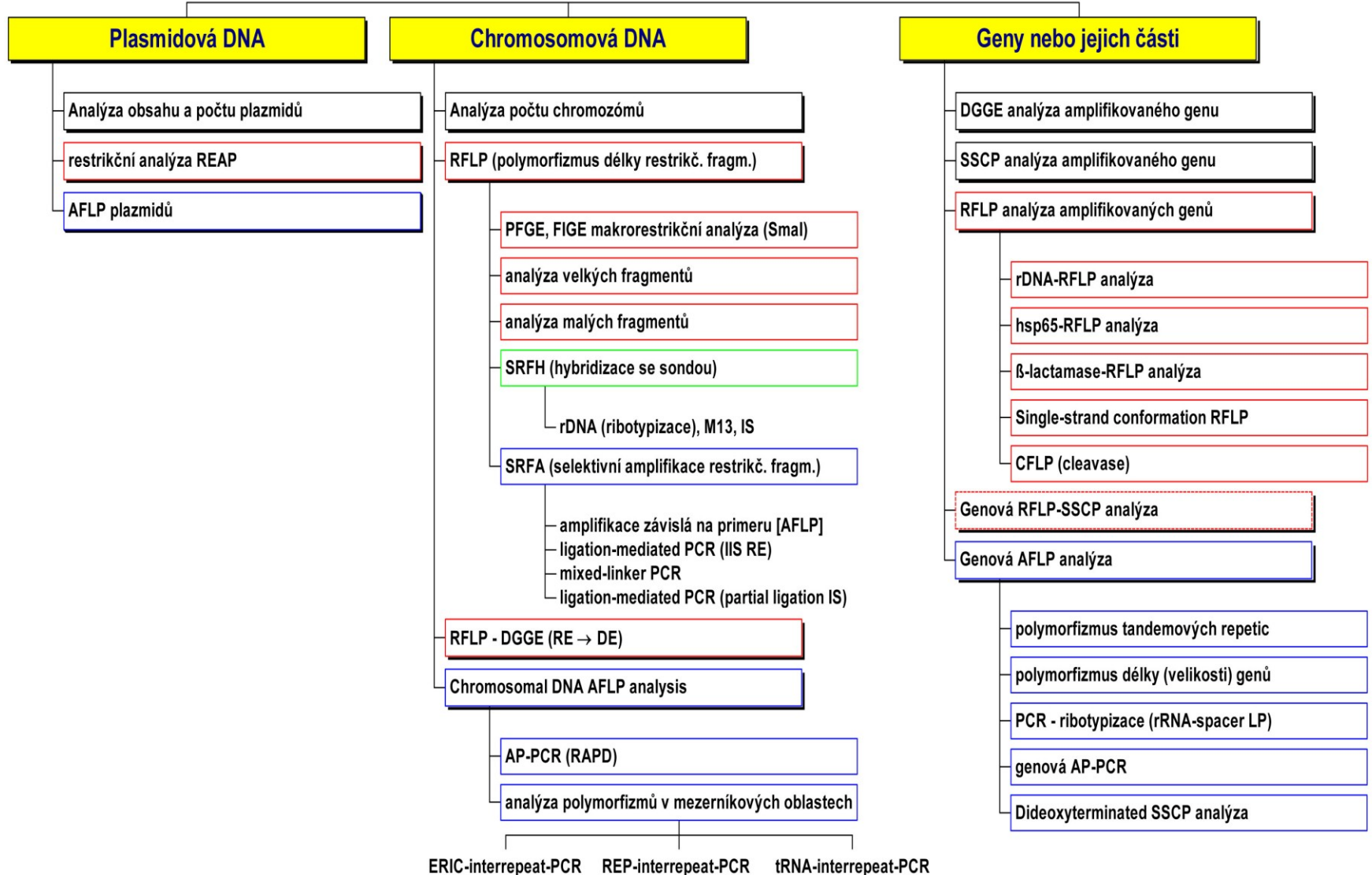
# Molekulární metody pro detekci polymorfizmů v genomech

- 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

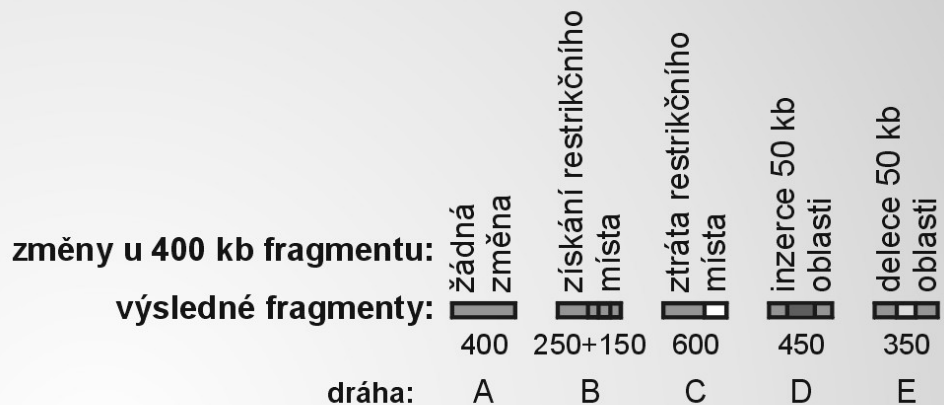
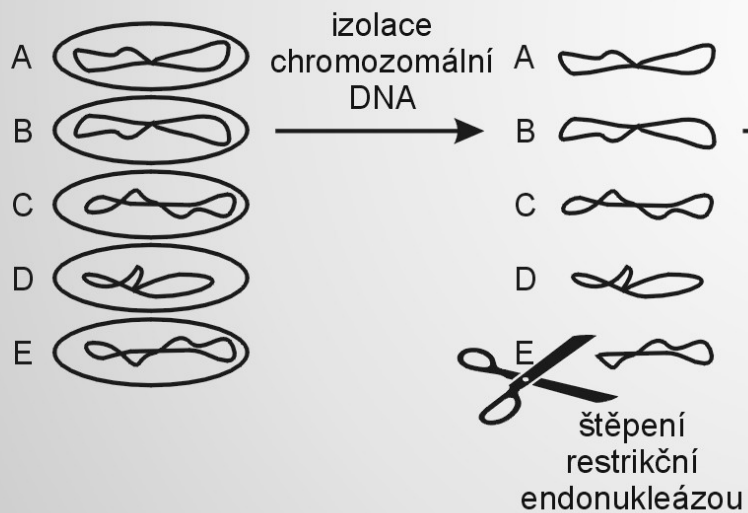


# **RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism**

Polymorfizmus délky  
restrikčních fragmentů

# Princip RFLP

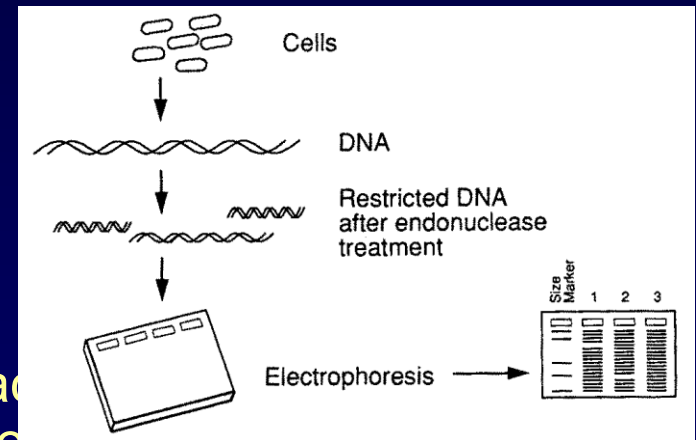
RFLP vzniká přestavbami sekvencí  
 inzercemi  
 delecemi  
 substitucemi bazí uvnitř restrikčních míst



gelová elektroforéza / Southernova hybridizace

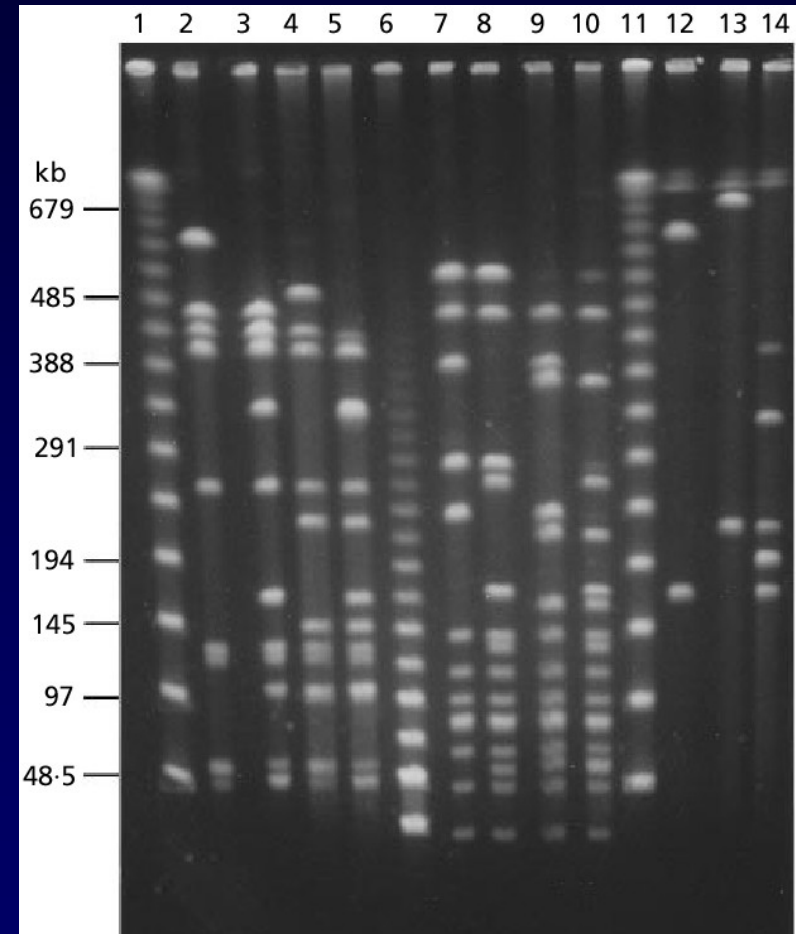
# Restrikční analýza chromozomální DNA (REA)

- 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



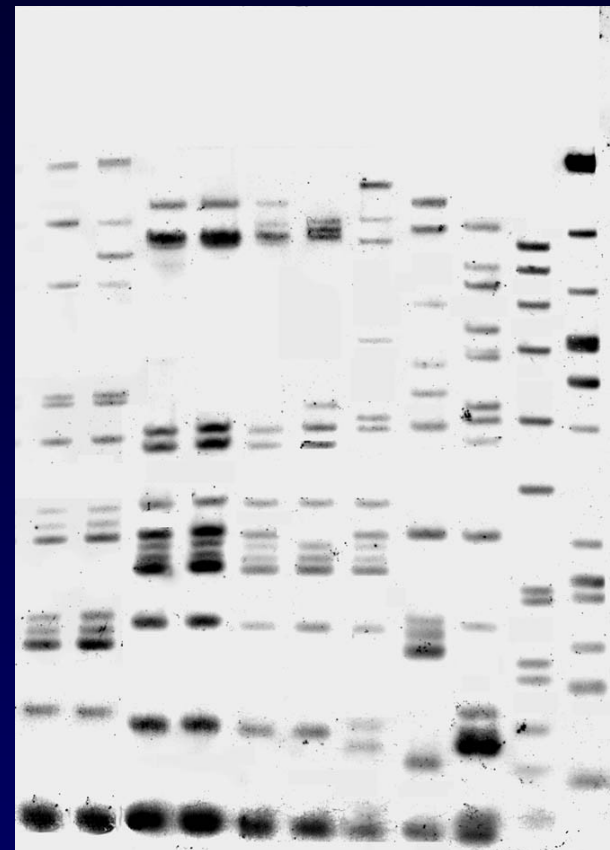
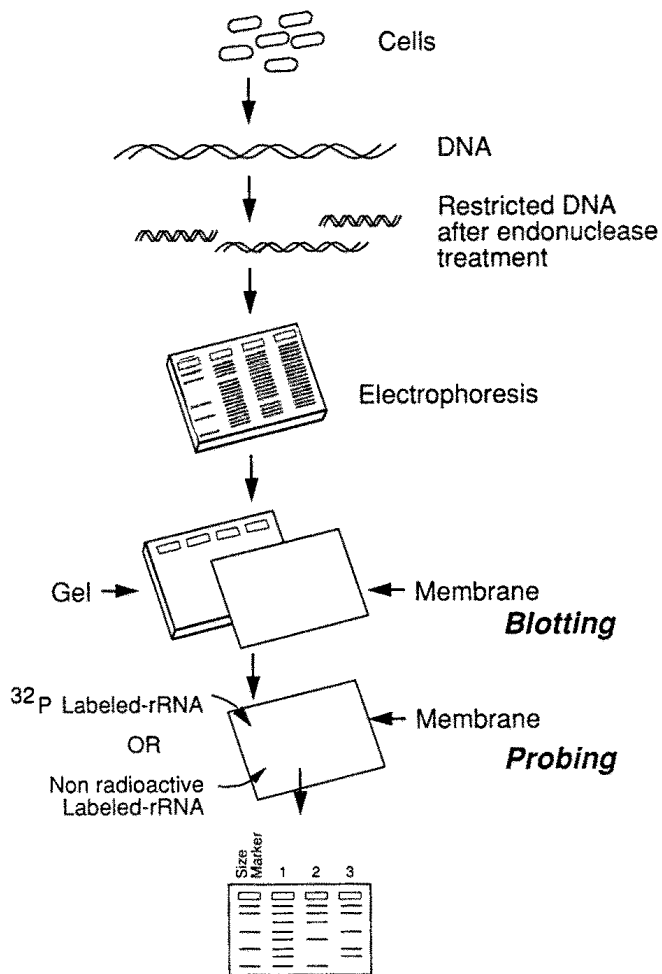
# Makrorestrikční analýza chromozomální DNA pomocí PFGE

- 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*.

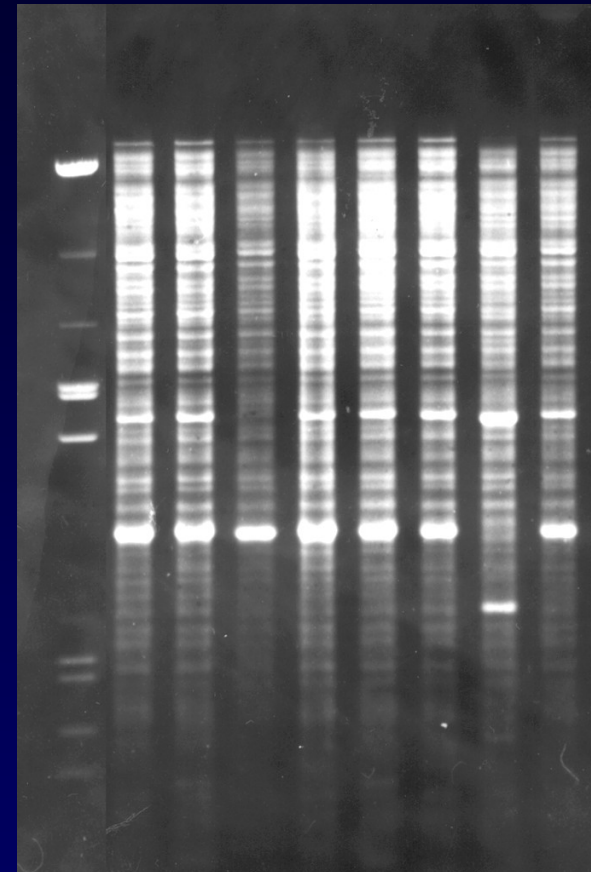
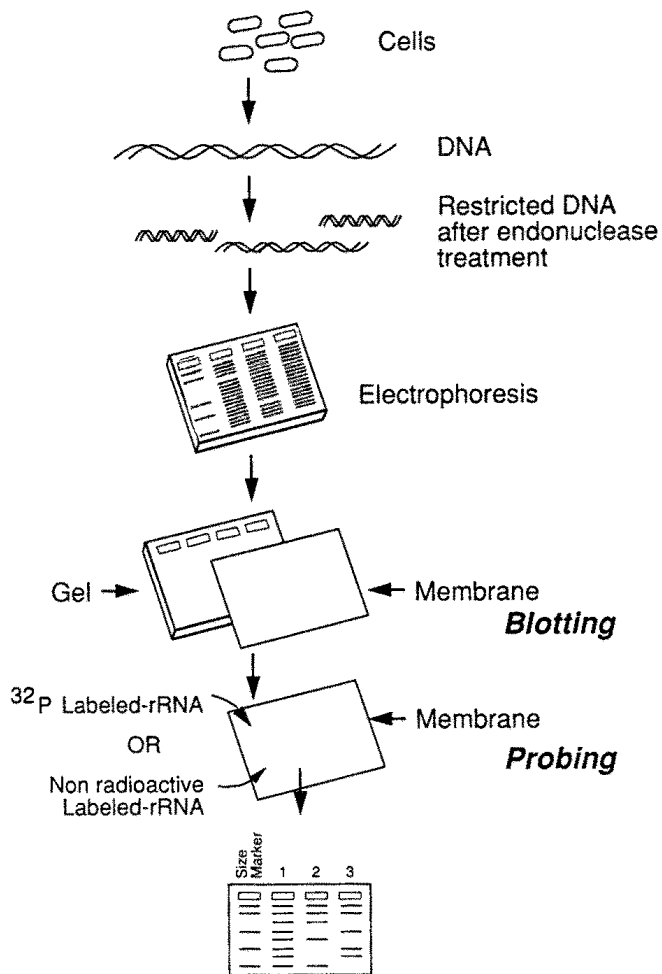
# Princip selektivní hybridizace



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

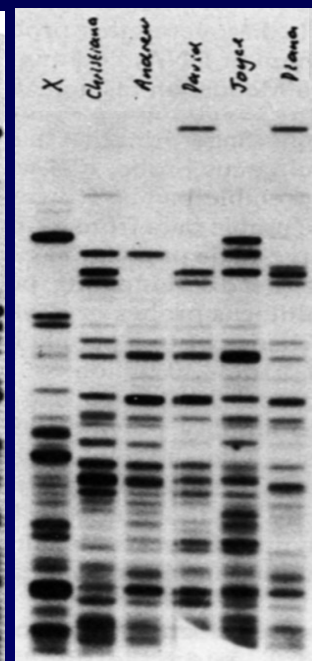
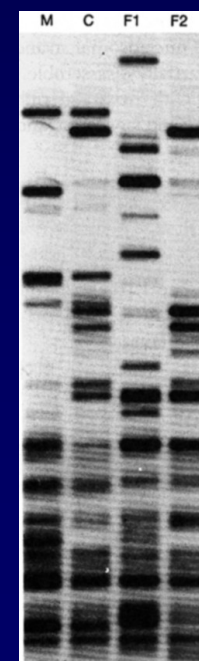
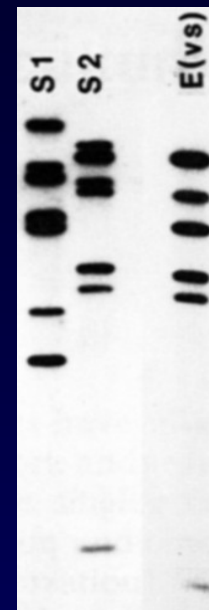
- Hybridizují k jedné hypervariabilní oblasti genomu a vytvářejí vzor o 1-2 proužcích
- Pro identifikační účely se používá směs („koktejl“) jednolokusových sond
- Jsou citlivější a dávají jednodušší obraz než multilokusové sondy
- Pro hybridizaci je třeba min 10 ng DNA

## • 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

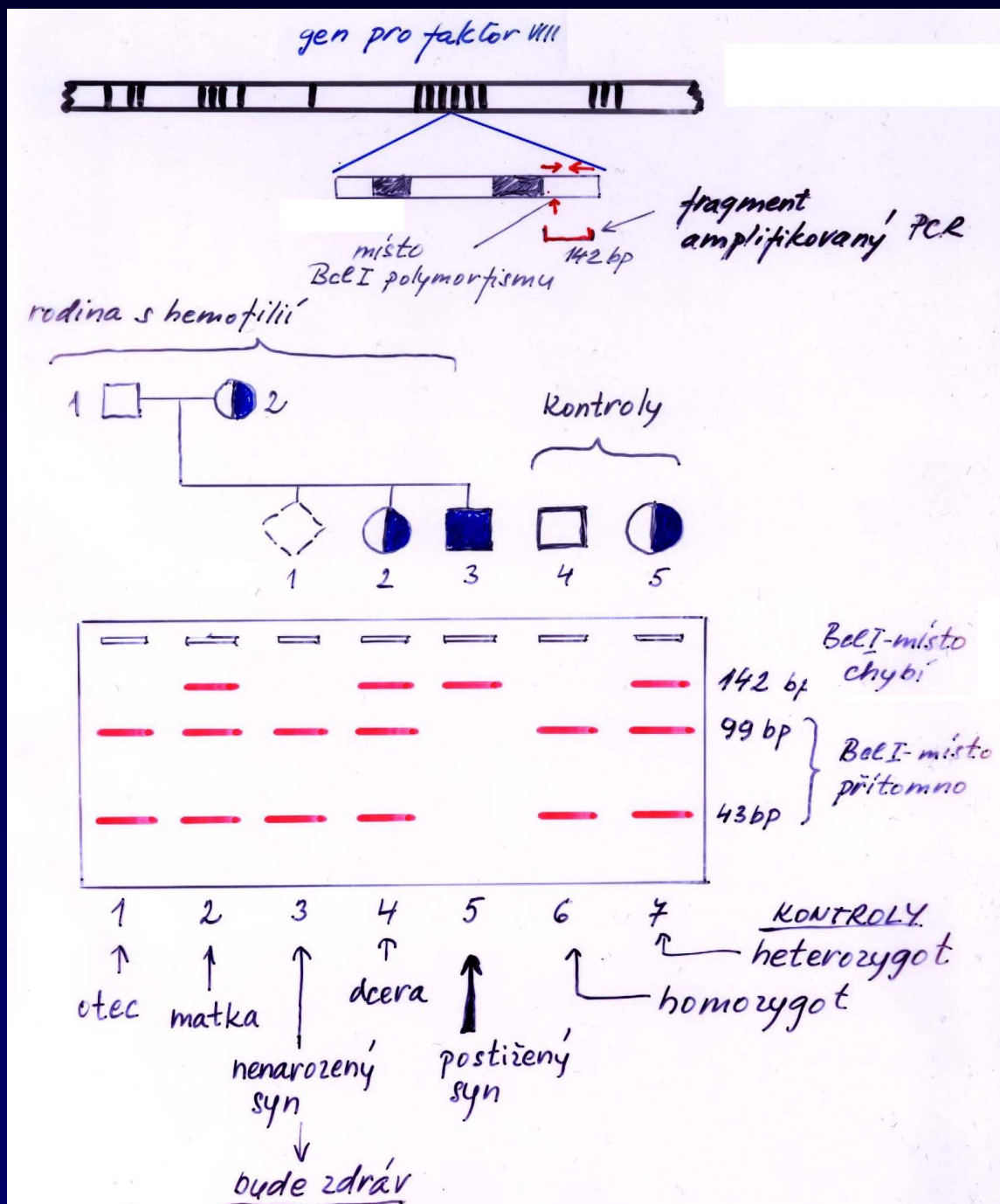
$$0,25^{36}=10^{-22}$$

- 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

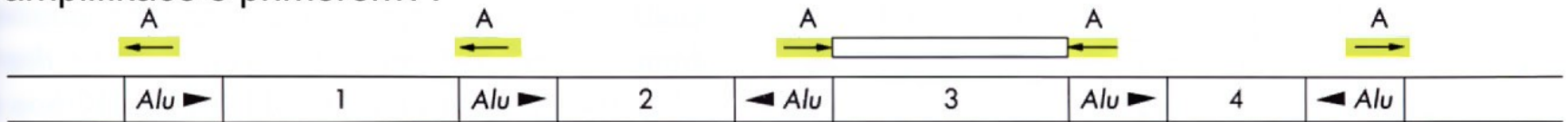
# Alu-PCR

Primer A 3' AACGTCACTCGGCTCTA 5'

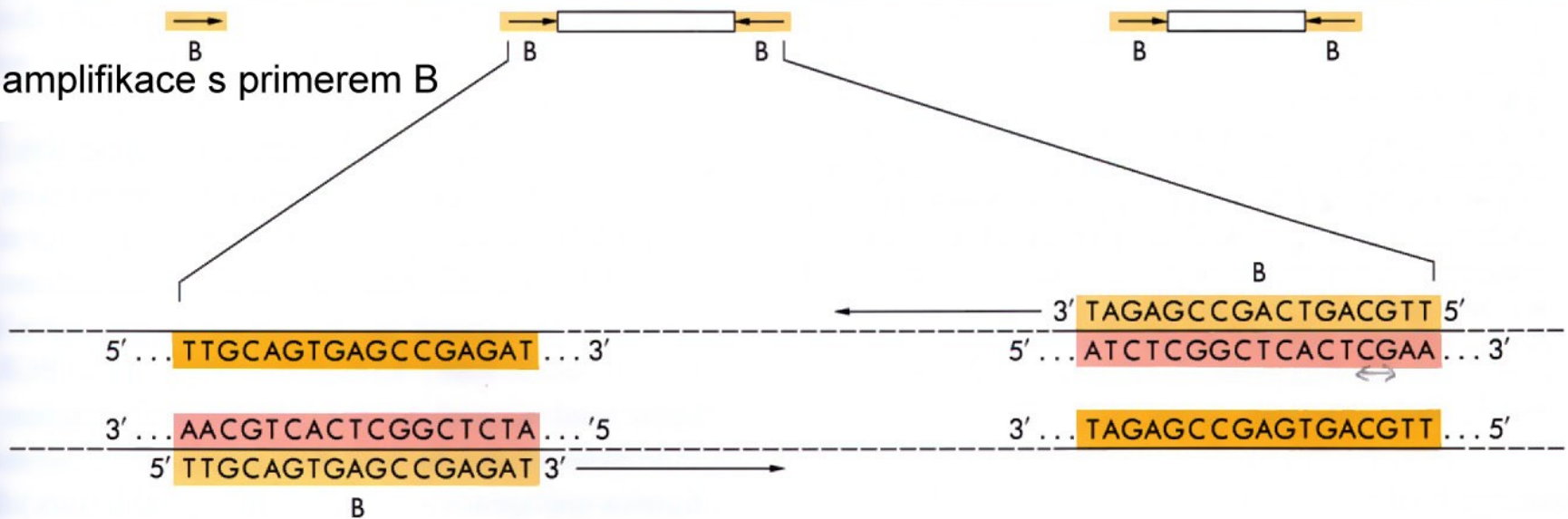
Část Alu sekvence  
jedinečná pro primáty  
5' ... TTGCAGTGAGCCGAGAT ... 3'  
3' ... AACGTCACTCGGCTCTA ... 5'

Primer B 5' TTGCAGTGAGCCGAGAT 3'

amplifikace s primerem A

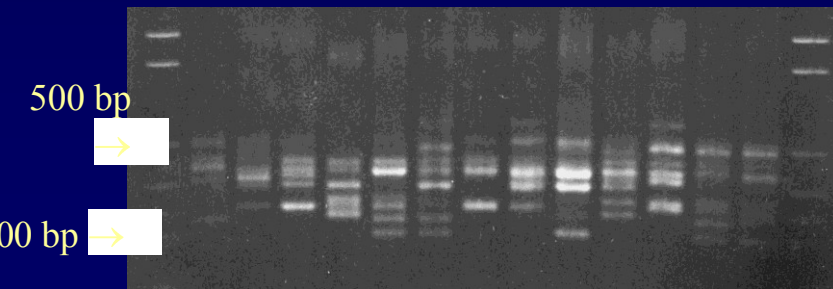
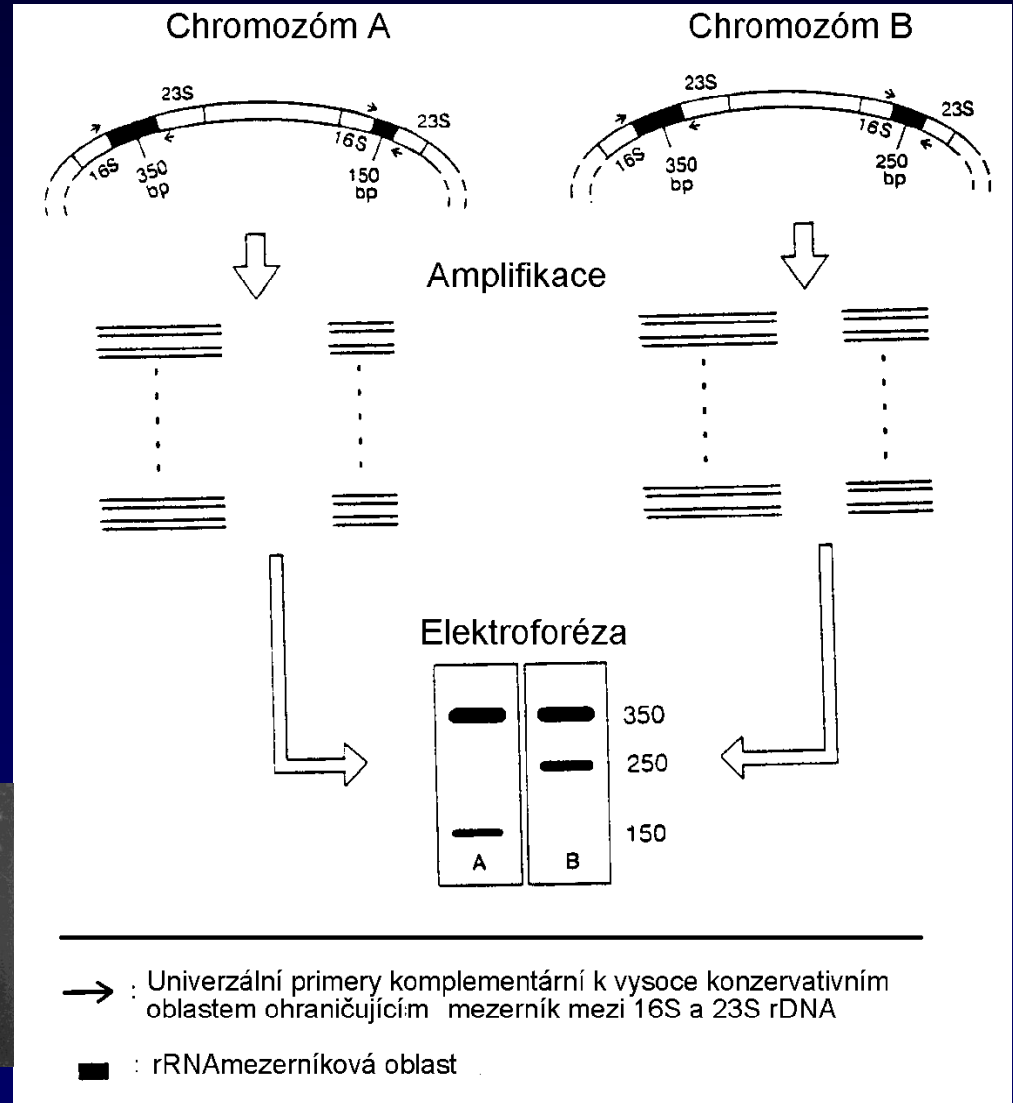


amplifikace s primerem B



# 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

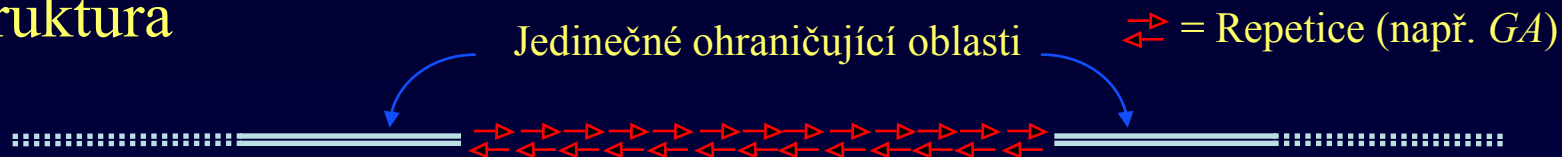
VNTR – Variable Number of Tandem  
Repeats

# Polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí (SSLP-PCR)

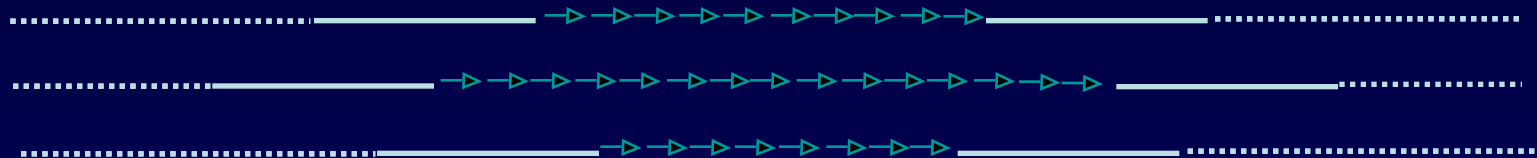
- Jednoduché repetitivní sekvence (SSR) jsou tandemové repetice o délce 2 až 10 bp (např. mikrosatelity) přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80.
- V důsledku mutací nebo rekombinace se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit.
- Primery pro tuto metodu jsou navrhovány tak, aby se připojovaly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

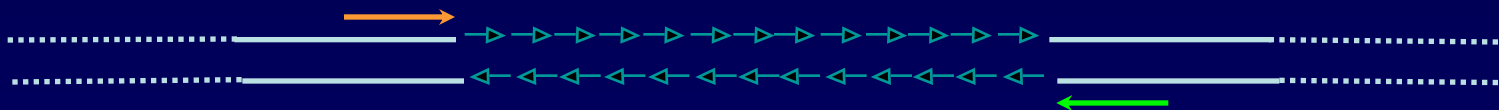
## ➤ Struktura



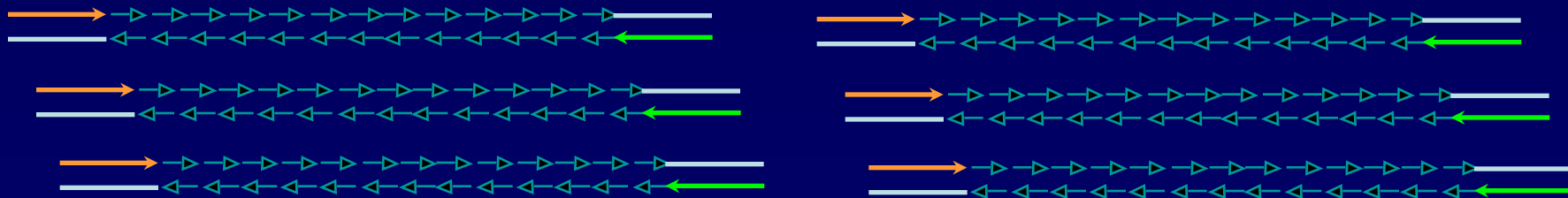
## ➤ Počet repeticí je velice variabilní mezi jedinci



Návrh primerů (↔) komplementárních k ohraničujícím sekvencím



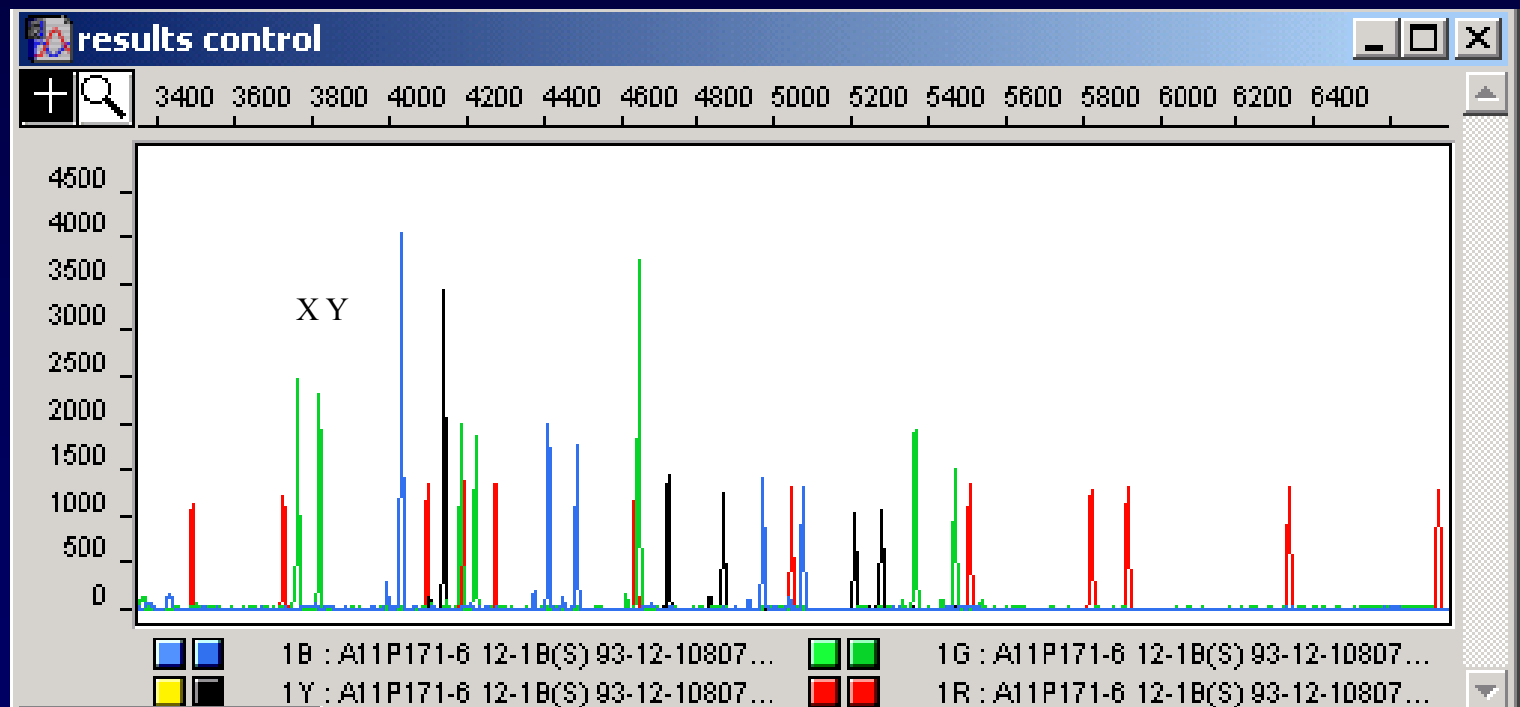
Amplifikace repeticí pomocí PCR



# 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

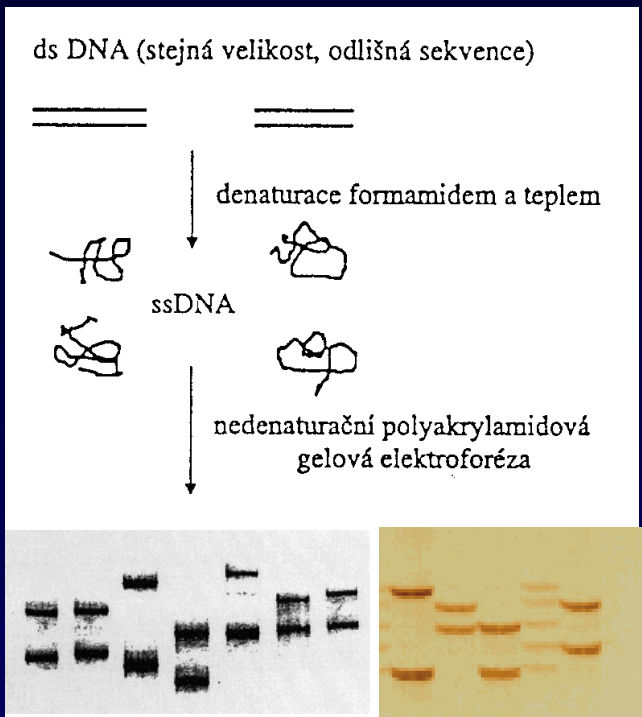
## SSCP a DSCP: Polymorfizmy detekované speciálními elektroforetickými metodami

- 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