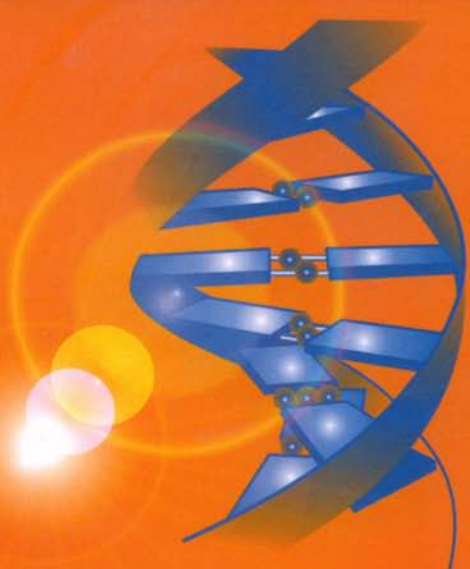
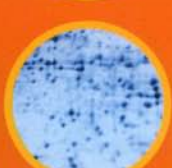
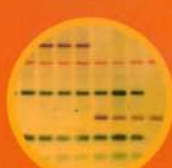
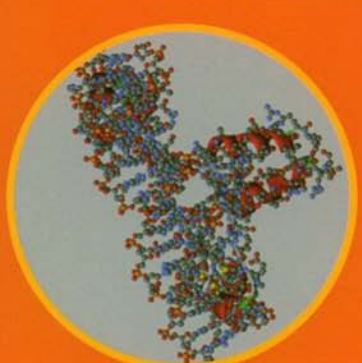
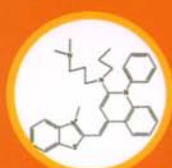


METODY MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE

Jan Šmarda, Jiří Doškař, Roman Pantůček,
Vladislava Růžičková, Jana Koptíková



Masarykova univerzita

Metody molekulární biologie

Jan Šmarda

Jiří Doškař

Roman Pantůček

Vladislava Růžičková

Jana Koptíková

Brno 2005

Obsah

Předmluva	5
I. Purifikace a separace nukleových kyselin (J. Doškař, V. Růžičková, R. Pantůček, J. Šmarda)	7
1. Extrakce a purifikace nukleových kyselin	7
2. Centrifugace	10
3. Elektroforéza nukleových kyselin	13
II. Manipulace s nukleovými kyselinami (J. Doškař a J. Šmarda)	17
1. Enzymy používané k úpravám nukleových kyselin	17
2. Hybridizace nukleových kyselin	20
III. Klonování DNA (J. Doškař)	29
IV. Fyzikální mapování DNA (genomu) (J. Doškař a R. Pantůček)	45
1. Konstrukce restrikčních map	45
2. Detekce polymorfizmů v genomech	54
V. Stanovení sekvence DNA (sekvencování DNA) (R. Pantůček)	59
VI. Amplifikace nukleových kyselin (R. Pantůček a J. Doškař)	73
1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	73
2. Varianty a modifikace PCR	85
3. Amplifikace nukleových kyselin za nepřítomnosti termofilní DNA-polymerázy	104
4. Metody pro amplifikaci sondy	106
VII. Transgenika (J. Šmarda)	111
1. Transfekce přechodná a stabilní	111
2. Cílené zásahy do genové exprese	116
VIII. Analýza genové exprese (J. Šmarda)	121
1. Studium transkripce	121
2. Srovnání transkriptomů	126
3. Analýza promotorů a interakcí protein – DNA	133
4. Analýza translace	137
5. Analýza meziproteinových interakcí	148
IX. Metody molekulární virologie (V. Růžičková)	151
X. Bioinformatika (R. Pantůček)	161
1. Molekulárně biologické databáze	162
2. Textové vyhledávání v databázích	163
3. Vyhledávání podobností sekvencí	167
4. Vyhledávání genů a funkčních oblastí	170
5. Klasifikace proteinů	170
Seznam anglických zkratk	173
Literatura	177
Rejstřík	181

Předmluva

Tato učebnice je určena studentům bakalářských a magisterských studijních programů přírodovědeckých, lékařských a veterinárních vysokých škol a laboratorním pracovníkům, kteří se zajímají o základní metodické přístupy současné molekulární biologie. Cílem autorů je poskytnout čtenářům přehled těchto metod, popsat jejich principy a vysvětlit možnosti jejich praktických aplikací. Současně s dynamickým vývojem celého oboru molekulární biologie se objevují a rychle rozšiřují nové technologie a metodické přístupy. Tato učebnice si neklade za cíl poskytnout celkový přehled a současném stavu v této oblasti, ale zaměřuje se na základní „klasické“ metody, jejichž principů však často využívají i ty nejmodernější metody současnosti. Pro zvýšení názornosti jsme velkou pozornost věnovali obrázkům, ve kterých jsme se snažili schematicky znázornit principy popisovaných metod. Věříme, že učebnice věnovaná principům základních metod molekulární biologie pomůže odstranit citelnou mezeru v nabídce učebních textů tohoto typu. Autoři děkují sponzorům, nakladatelství Espero Publishing, s.r.o., za poskytnutí předloh k některým obrázkům a recenzentům za laskavé posouzení práce a cenné připomínky.

V Brně, 10. 9. 2005

Jan Šmarda
za autorský kolektiv

I. Purifikace a separace nukleových kyselin

1. Extrakce a purifikace nukleových kyselin

První fází většiny metod, které popisujeme v této knize, je extrakce DNA nebo RNA z buněk a jejich oddělení od ostatních buněčných složek. Kvalita izolovaného materiálu často rozhoduje o úspěšnosti navazujících postupů. Cílem purifikačních procesů je získat nukleovou kyselinu v nativním stavu v dostatečném množství a čistotě. Metody izolace nukleových kyselin využívají (1) rozdílné rozpustnosti biologických makromolekul, (2) adsorpce na pevný podklad nebo (3) ultracentrifugace v gradientních roztocích. Výběr metody purifikace DNA nebo RNA závisí na způsobu její následné analýzy. Např. DNA určená k hybridizaci musí být zbavena kontaminujících látek jakými jsou např. glykogen, proteiny nebo ionty kovů, které by mohly bránit reasociaci DNA. Rovněž požadavky na množství a integritu izolované nukleové kyseliny se mohou u různých metod podstatně lišit. Např. polymerázová řetězová reakce nevyžaduje velké množství vstupního materiálu, zatímco pro podrobné genetické analýzy je vhodné připravit nukleovou kyselinu v dostatečném zásobním množství. Jiné typy analýz jako pulzní gelová elektroforéza nebo štěpení BAL31 vyžadují zase vysokou integritu izolované DNA.

LYZE BUNĚK A TKÁNÍ. Existuje mnoho různých metod purifikace nukleových kyselin, ale jejich základní rysy jsou společné. Prvním předpokladem je dostupnost vstupního materiálu, kterým mohou být např. kultury bakteriálních nebo eukaryotických buněk, které je třeba oddělit od růstového média (obvykle centrifugací) nebo komplexnější vzorky tkání a pletiv, které musí být před lyzí buněk homogenizovány. Rostlinná pletiva se např. rozmělnují v tekutém dusíku na jemný prášek. Zdrojem DNA mohou být také buněčné organely nebo virové částice izolované centrifugací v hustotním gradientu (str. 12). Pokud je to možné, měl by být vstupní materiál čerstvý, zamražený nebo lyofilizovaný, aby se zabránilo degradaci nukleových kyselin enzymy přítomnými v buněčném extraktu.

K uvolnění vnitřního obsahu buněk je nutné vyvolat lyzi buněčné stěny. Výběr způsobu indukce lyze závisí na typu buňky. Stěny bakteriálních buněk se obvykle rozrušují lysozymem, tj. enzymem, který se přirozeně vyskytuje ve vaječném bílku a slzách. Současně s lysozymem se používají detergenty pro solubilizaci cytoplazmatické membrány (např. laurylsíran sodný) a chelatační činidla (např. EDTA), která jednak vážou dvojmocné kationty a tím destabilizují vnější bakteriální membránu, jednak inhibují deoxyribonukleázy (DNázy). Stěny buněk rostlin a hub se od stěn buněk bakteriálních liší svým chemickým složením, a proto vyžadují jiné způsoby degradace. Často se využívá mechanické dezintegrace kombinované s působením degradačních enzymů, např. celuláz. Lyzi živočišných buněk, které nemají buněčnou stěnu, lze indukovat jemnějšími metodami, např. slabými neiontovými detergenty. Po rozrušení buněčné stěny a plazmatické membrány se v roztoku objeví jejich degradační produkty spolu se nitrobuněčnými složkami a vzniká komplexní směs DNA, RNA, proteinů, lipidů, sacharidů nízkomolekulárních látek a uhlovodíků. Lyze buňky obvykle vede k fragmentaci chromozomové DNA. Pokud se má izolovaná DNA zachovat intaktní, je nutné použít co nejjemnějších podmínek lyze, tj. udržovat lyzační směs v pufrovaném médiu a chladu. Důležité je rovněž vyhnout se fragmentaci DNA, ke které může dojít při pipetování lyzátu.

PŘEČIŠŤOVACÍ ENZYMY. Odstranění RNA z purifikované DNA lze snadno dosáhnout působením ribonukleázy (RNázy). Tento enzym je stabilní i při vysoké teplotě a proto je možné jej zahřátím na teplotu 65 °C zbavit stop nežádoucích deoxyribonukleáz,

kteřé by DNA mohly poškodit. Odstranění DNA při purifikaci RNA bývalo obtížnější, protože vyžadovalo použití DNázy postrádající jakoukoliv RNázovou aktivitu. V současné době jsou však tyto enzymy komerčně dostupné. Přečištění purifikované nukleové kyseliny působením zmíněných enzymů se používá jen v některých postupech. Pokud určitá kontaminace nukleové kyseliny není v daném postupu na závadu nebo k jejímu odstranění postačují následné purifikační kroky, je možné tento krok vynechat. Pro odstranění proteinů z buněčných lyzátů se používají proteázy, např. proteináza K nebo pronáza E. Odstranění proteinů je při purifikaci nukleových kyselin velmi důležité, protože buňky obsahují jednak řadu enzymů, které nukleové kyseliny degradují, a dále proteiny, které se na DNA vážou a tak mohou omezovat účinnost následujících experimentů.

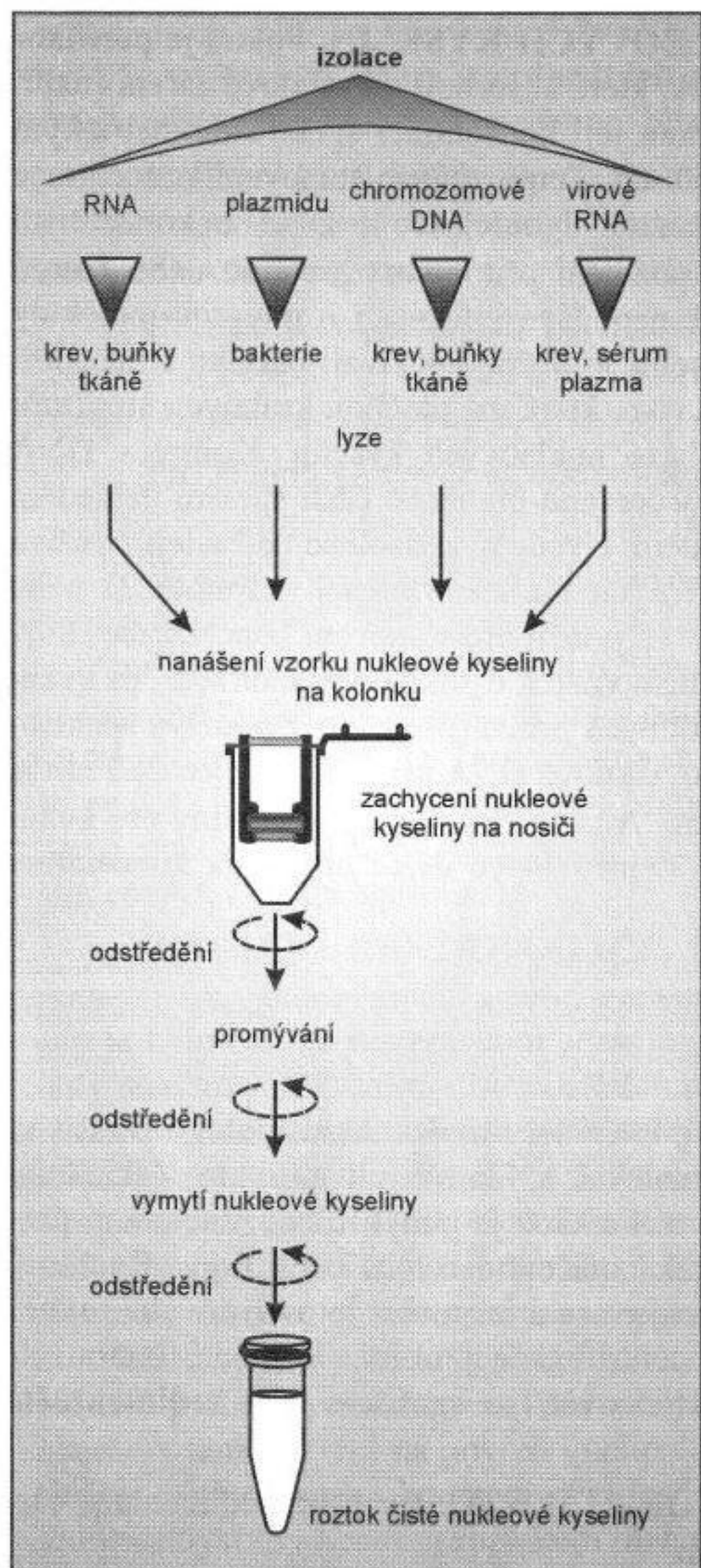
EXTRAKCE SMĚSÍ FENOL-CHLOROFORM. Klasickým a stále hojně používaným postupem pro odstranění proteinů z buněčných lyzátů je extrakce pufrém ekvilibrovaným fenolem nebo směsí fenolu a chloroformu. Tyto organické látky se nemísí s vodou, a proto po přidání do vodného prostředí buněčného lyzátu způsobí tvorbu dvou vrstev (fází). Když se směs důkladně promíchá, dojde k denaturaci proteinů a jejich vysrážení. Sraženinu proteinů lze centrifugací koncentrovat do fázového rozhraní, oddělujícího těžší organickou fází od lehčí vodné fáze. Pokud se používá fenol ekvilibrovaný neutrálním nebo alkalickým pufrém, nukleové kyseliny (DNA i RNA) zůstávají ve vodné fázi. Pokud se k extrakci použije kyselý fenol, přechází DNA do organické fáze a ve vodné fázi zůstává pouze RNA. Této skutečnosti se využívá při izolaci RNA. Existují však i takové lyzační postupy, které s využitím solí zvýší hustotu vodné fáze natolik, že dojde k převrácení fází.

SRÁŽENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN ALKOHOLEM. Po extrakci fenolem máme k dispozici vodný roztok nukleové kyseliny zbavený proteinů, který je však pravděpodobně příliš naředěný a navíc zřejmě obsahuje stopy fenolu a chloroformu. Obzvláště fenol má určitý stupeň rozpustnosti ve vodě a mohl by způsobit nežádoucí denaturaci enzymů při další práci s purifikovanou nukleovou kyselinou. Převedení nukleové kyseliny do malého objemu a její přečištění je možno zajistit srážením (precipitací) alkoholem, obvykle etanolem nebo izopropanolem. Za přítomnosti jednomocných iontů (Na^+ , K^+ nebo NH_4^+) je možné nukleové kyseliny srážet do podoby agregátu, který při centrifugaci sedimentuje na dno zkumavky. Účinnému srážení nukleových kyselin v nízkých koncentracích napomáhá snížení teploty na $-70\text{ }^\circ\text{C}$ a přidání solí (2M NaCl, 2M LiCl, 3M octan sodný nebo 10M octan amonný). Je-li naopak třeba zvýšit selektivitu srážení pro DNA, tj. minimalizovat současnou precipitaci RNA, provádí se srážení při laboratorní teplotě. Soli mohou být částečně sráženy spolu s nukleovou kyselinou a z precipitátu se odstraňují promytím 70% etanolem. Po odpaření etanolových par se DNA rozpustí ve vodném roztoku, který obvykle obsahuje pufr Tris-HCl (pH 7,5–8,0) a inhibitor nukleáz, EDTA. Způsob uchování nukleové kyseliny závisí na její velikosti, konformaci a dalším využití. Roztok DNA se obvykle uchovává při $4\text{ }^\circ\text{C}$. Teplota $-20\text{ }^\circ\text{C}$ není vhodná pro lineární DNA o velikosti přesahující 20 kb, která je křehká a během zamrazování a rozmrazování se snadno láme. Pokud je třeba DNA skladovat dlouhodobě ve zmrazeném stavu, je vhodné ji předem rozdělit do několika alikvotů.

ALKALICKÁ DENATURACE. Tato metoda se běžně používá pro oddělení plazmidů od chromozomové DNA v extraktech bakteriálních buněk. Chromozomová DNA je v extraktech bakteriálních buněk přítomna v podobě lineárních fragmentů, které vznikají při částečné fragmentaci DNA v průběhu lyze buněk. Při zvýšení pH na hodnotu kolem 12 se přeruší vodíkové vazby mezi nukleotidy a dochází tak k oddělení lineárních řetězců – denaturaci DNA. Plazmidy běžných velikostí, které se používají při klonování DNA, jsou stabilnější a protože zůstávají v nadšroubovicové formě, nejsou během lyze buňky porušeny. I když vysoké pH způsobí přerušování vodíkových vazeb i v plazmidové DNA, její řetězce se nemohou fyzicky oddělit, a po následném snížení pH se snadno obnoví původní struktura

dvouřetězcové DNA plazmidu. Naopak oddělené řetězce chromozomové DNA nemohou tak rychle renaturovat, agregují v přítomnosti SDS, který je součástí lyzačního pufru a octanu draselného, který je použit k neutralizaci lyzátu s proteiny a dalšími složkami buněk (např. zbytky buněčných stěn) do nerozpustné hmoty, která může být odstraněna centrifugací. Plazmidová DNA, která v roztoku zůstává, je dostatečně čistá a použitelná pro mnoho aplikací, včetně restričního štěpení. Pokud je třeba provést další přečištění plazmidové DNA, je vhodné provést přesrážení octanem amonným a izopropanolem, afinitní chromatografii nebo centrifugaci v gradientu CsCl s etidiumbromidem.

PURIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN CHROMATOGRAFIÍ. Při purifikaci



Obr. 1 Izolace a purifikace nukleových kyselin na chromatografických kolonkách

nukleových kyselin na chromatografických kolonkách, které jsou často vsazeny do centrifugačních mikrozkušavek a kombinují tak chromatografii s centrifugací („spin columns“) se používají dva hlavní přístupy. Při gelové chromatografii se vzorek nanáší na kolonu, jejíž náplň je tvořena malými porézními zrnky nosiče. Malé molekuly, jako soli, volné nukleotidy, atd. prostupují do porézní matrice a tím zpomalují svůj pohyb kolonou, zatímco velké molekuly nukleových kyselin zrnky matrice neprostupují a procházejí proto kolonou rychleji. Tento typ purifikace představuje účinnou alternativu k purifikaci DNA srážením alkoholem. Při afinitní chromatografii je zajištěna interakce mezi makromolekulami vzorku a náplní kolony. Může se jednat o interakci elektrické povahy, založené na afinitě kladně nabitých chemických skupin nosiče k negativně nabitým zbytkům kyseliny fosforečné v molekule DNA (iontoměničová chromatografie) nebo o více specifickou interakci např. mezi sekvencemi oligo-dT vázanými na zrnka nosiče a sekvencemi poly-A, které jsou přítomny na koncích molekul eukaryotické mRNA. V obou případech se využije imobilizace nukleových kyselin na nosiči a odmytí nežádoucích molekul, které kolonou volně procházejí. Následně, použitím jiného pufru se molekuly nukleových kyselin z nosiče uvolní. Nukleové kyseliny izolované prostřednictvím chromatografických technik mají vysoký stupeň čistoty. V současné době je k dispozici řada komerčních sestav uzpůsobených pro využití afinitní chromatografie pro izolaci DNA z nejrůznějších materiálů (obr. 1). Tyto komerční sestavy často používají afinitní membrány místo klasických sloupcových nosičů.

PURIFIKACE RIBONUKLEOVÝCH KYSELIN. Vzhledem k tomu, že molekuly RNA jsou mnohem méně stabilní než molekuly DNA, izolace RNA je náročnější a vyžaduje přísnější podmínky, např. použití vody upravené inhibitorem RNázy (0,1 % dietylpYROKARBONÁTEM) a výchozí materiál z živočišných tkání je homogenizován za přítomnosti antioxidačních činidel (β -merkaptoetanol, dithiotreitol). Proteiny se odstraní fenolem ekvilibrovaným vodou při 60 °C. Oddělení jednotlivých frakcí se provádí chlazenou centrifugací. Kontaminující DNA je odstraněna DNázou zbavenou RNáz. RNA se sráží etanolem za přítomnosti LiCl a uchovává v roztoku pufru při -70 °C. Získání neporušené velmi čisté RNA je základním předpokladem pro řadu důležitých experimentů, např. pro northernový přenos, translaci *in vitro*, RT-PCR, zakládání knihoven cDNA, atd.

DETEKCE A KVANTIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN. Pokud je purifikovaná DNA dostatečně čistá, tj. zbavená všech látek, které absorbují ultrafialové záření (např. RNA, volných nukleotidů, proteinů), lze odhadnout její koncentraci spektrofotometrickým měřením absorbance roztoku při vlnové délce 260 nm. Tento způsob stanovení koncentrace DNA je jednoduchý, ale ne příliš selektivní. Roztok dvouřetězcové DNA o koncentraci 50 $\mu\text{g/ml}$ má absorbanci 1. Tuto hodnotu však pozmění přítomnost proteinů nebo fenolu v roztoku DNA. Navíc údaj o úrovni absorbance nepodává informaci o integritě molekuly DNA. Pro detekci a kvantifikaci nukleových kyselin se běžně používají barviva typu etidiumbromidu. Etidiumbromid je fenantridinové barvivo, které má plochou kruhovou strukturu umožňující jeho vmezeření (interkalaci) mezi báze nukleových kyselin. Komplex DNA s navázaným barvivem pak může být detekován v červeno-oranžové části spektra vzhledem ke své fluorescenci po ozáření ultrafialovým světlem. Uvedený způsob se nejčastěji používá pro barvení molekul nukleových kyselin rozdělených ultracentrifugací (kapitola 2) nebo gelovou elektroforézou (kapitola 3) a může se rovněž použít pro stanovení koncentrace DNA nebo RNA ve vzorku, pokud je k dispozici referenční vzorek o známé koncentraci. Pro kvantifikaci jednovláknové DNA, např. oligonukleotidových primerů se rovněž používá spektrofotometrický přístup. Absorbance 1 roztoku jednovláknové DNA při vlnové délce 260 nm je v tomto případě ekvivalentní koncentraci 30 $\mu\text{g/ml}$. Analogický přístup je vhodný pro kvantifikaci jednovláknové RNA. Absorbance 1 při stejné vlnové délce odpovídá koncentraci RNA 40 $\mu\text{g/ml}$.

2. Centrifugace

Centrifugace patří k separačním metodám, které se v molekulární biologii používají k izolaci, purifikaci a charakterizaci biomakromolekul a buněčných struktur. Základním principem separace založené na centrifugačních technikách je pohyb částic v tekutém prostředí pod vlivem odstředivého pole, které vzniká otáčením rotoru centrifugy. Rychlost, s jakou částice sedimentuje, závisí na její velikosti, tvaru a hustotě a je ovlivňována rovněž vlastnostmi prostředí a podmínkami, při nichž centrifugace probíhá. Veličina, kterou lze rychlost pohybu částice při centrifugaci charakterizovat, se označuje jako **sedimentační koeficient** nebo též **hodnota S**.

STANOVENÍ SEDIMENTAČNÍHO KOEFICIENTU. Rychlost sedimentace částice při centrifugaci lze vyjádřit obecným vztahem:

$$dr/dt = S \cdot a = s \cdot \omega^2 r,$$

kde

r je vzdálenost částice od osy otáčení,

t je doba centrifugace,

a je odstředivé zrychlení,
 S je sedimentační koeficient a
 ω je úhlová rychlost rotoru při otáčení.

Po úpravě a integraci uvedeného vztahu získáme rovnici

$$S = d(\ln r) / \omega^2 dt = \ln r_2 / r_1 / \omega^2 (t_2 - t_1),$$

podle níž lze vypočítat hodnotu sedimentačního koeficientu analyzované částice, jestliže známe její polohy r_1 a r_2 v centrifugační zkumavce v příslušných časových intervalech t_1 a t_2 a rychlost otáčení. Abychom mohli srovnat hodnoty S stanovené při různých podmínkách centrifugace, jsou získané hodnoty obvykle přepočítány na standardní podmínky. Tím získáme hodnoty **standardních sedimentačních koeficientů** $S_{20,w}^0$, které charakterizují sedimentaci částic o koncentraci blízké nule ve vodě při 20 °C.

Hodnoty koeficientů se pro většinu biomakromolekul a molekulárních komplexů pohybují v rozmezí řádů 10^{-11} až 10^{-13} sekund. Vyjadřují se proto ve **Svedbergových jednotkách** (S), kde 1 S (Svedberg) = 10^{-13} sekundy.

Hodnot sedimentačních koeficientů se využívá k popisu a charakterizaci biomakromolekul, buněčných organel a jejich struktur. Příkladem je označování jednotlivých druhů ribozomových RNA (23S-rRNA, 16S-rRNA) nebo ribozomových podjednotek (30S, 50S).

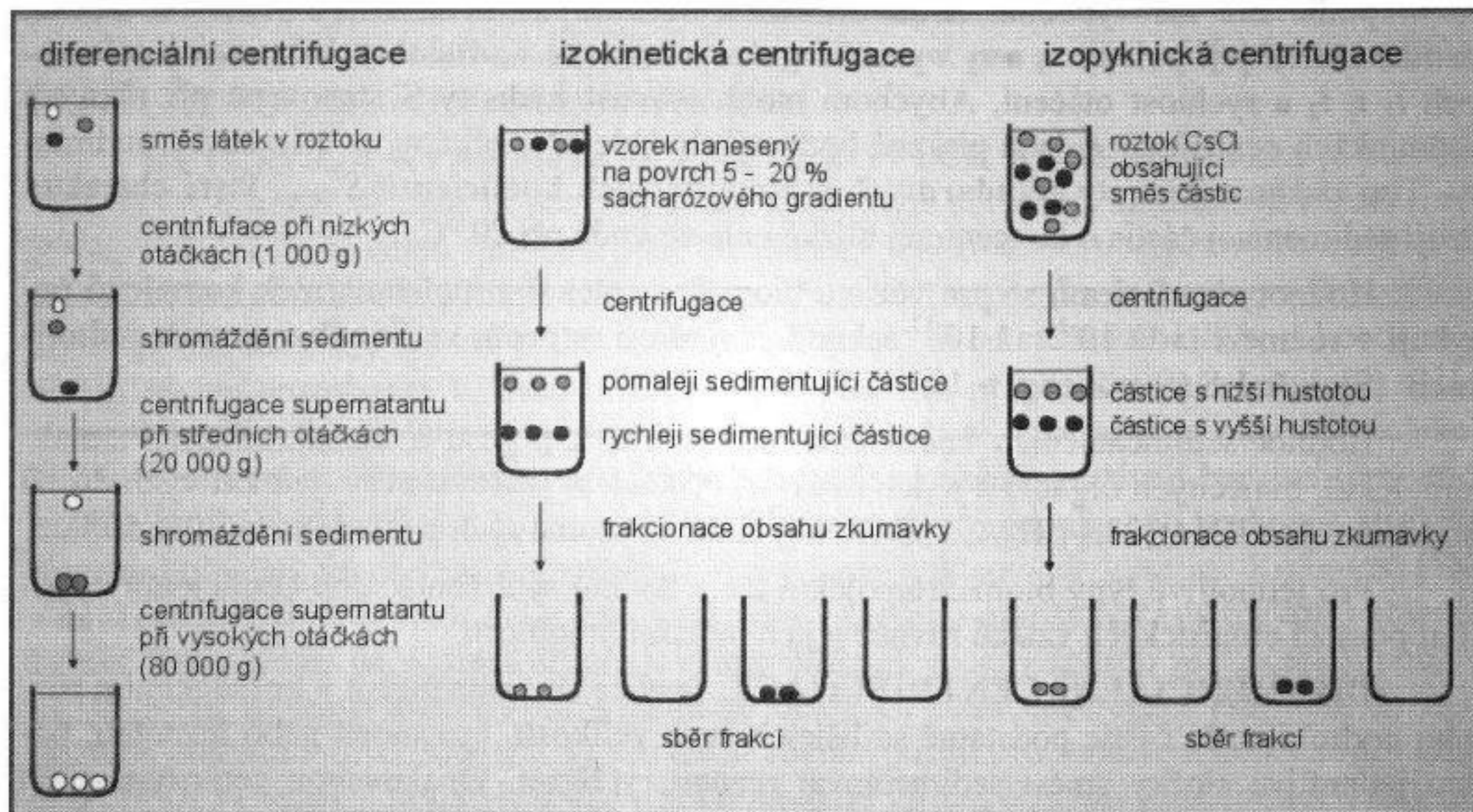
Pro jednotlivé typy biomakromolekul lze z hodnot sedimentačních koeficientů vypočítat pomocí empirických vztahů rovněž jejich molární hmotnosti.

DIFERENCIÁLNÍ CENTRIFUGACE. Jestliže se centrifugaci v homogenním roztoku podrobí směs částic podstatně se lišících svou velikostí, hmotností nebo hustotou, budou jednotlivé složky směsi sedimentovat různou rychlostí. Opakovanou centrifugací při postupném zvyšování otáček tak lze z původní směsi získat jednotlivé složky nebo frakce ve formě sedimentu (obr. 2). Tento postup se označuje jako diferenciální centrifugace a využívá se nejčastěji jako výchozí krok pro hrubou separaci a izolaci složek z lyzátů buněk nebo homogenátů tkání, např. buněčných jader, ribozomů, mitochondrií, buněčných membrán, nukleových kyselin a proteinů.

ZONÁLNÍ CENTRIFUGACE. Fyzikální vlastnosti jednotlivých komponent přítomných ve výchozí směsi a tím i rychlost jejich sedimentace nejsou vždy odlišné natolik, aby je bylo možné diferenciální centrifugací účinně separovat. Příkladem mohou být různé typy nukleových kyselin, ribozomálních podjednotek, nebo jiné částice, vykazující podobné vlastnosti. Pro separaci těchto látek se využívá **zonální centrifugace**, při níž je homogenní roztok v centrifugační zkumavce nahrazen roztokem, jehož koncentrace od povrchu ke dnu zkumavky narůstá. Takový roztok se označuje jako **gradientní**. K jeho přípravě se používají dobře rozpustné a vůči analyzovaným částicím inertní látky, jako je např. sacharóza nebo glycerol. Vzrůstající hustota a tím i viskozita gradientního roztoku eliminují vliv vzrůstajícího odstředivého zrychlení směrem od osy otáčení, čímž brání nárůstu rychlosti sedimentace částic v průběhu centrifugace. Před zahájením centrifugace se vzorek obsahující směs částic nanese v tenké vrstvě na povrch gradientního roztoku v centrifugační zkumavce. Jednotlivé složky výchozí směsi budou v závislosti na své velikosti, tvaru a hustotě při centrifugaci sedimentovat gradientním roztokem různou rychlostí a vytvářet dobře oddělené **zóny**. Gradient roztoku zároveň zabraňuje vnitřnímu proudění roztoku ve zkumavce, tím udržuje stabilitu a ostrost vytvořených zón a umožňuje tak jejich následné odebrání.

Volbou vhodných podmínek při zonální centrifugaci lze dosáhnout toho, aby rychlost sedimentace částic byla v průběhu centrifugace konstantní. Tento způsob centrifugace je označován jako **izokinetická centrifugace** a je využíván k podrobnější charakterizaci částic,

např. k přesnému stanovení jejich velikosti. Při analýze nukleových kyselin se např. používá 5–20% sacharózový gradient, v němž se koncentrace sacharózy lineárně mění od hladiny (5% roztok) ke dnu zkumavky (20% roztok). Pohyb vytvořených zón lze monitorovat buď přímo během centrifugace pomocí speciálních zařízení, která jsou součástí analytických centrifug, nebo lze jejich polohu stanovit po ukončení centrifugace buď spektrofotometricky, nebo změřením radioaktivity jednotlivých frakcí (obr. 2).



Obr. 2 Základní typy centrifugace

IZOPYKNICKÁ CENTRIFUGACE. Při této metodě centrifugace, označované též jako hustotní centrifugace nebo centrifugace do rovnováhy, se částice separují podle své hustoty. Nejjednodušší provedení této metody spočívá v přípravě homogenní směsi analyzovaných částic ve vhodném mediu a následné centrifugaci. Během centrifugace tato media sama vytvoří koncentrační a tím i hustotní gradient, v němž se částice analyzovaných látek pohybují oběma směry tak dlouho, dokud nedosáhnou polohy, v níž je hustota roztoku shodná s hustotou částic (obr. 2). Takto stanovená hustota se označuje jako **vznášivá hustota**. Její hodnoty jsou ovlivněny interakcí částic s ionty roztoku a jsou obvykle vyšší než je hustota částic v buňkách.

Při jiném postupu se gradient připravuje v centrifugační zkumavce předem postupným navrstvováním roztoků o různé koncentraci a vzorek je pak nanesen na jeho povrch. Gradienty tohoto typu mohou být kontinuální nebo diskontinuální, podle toho, zda se koncentrace roztoku mění plynule nebo stupňovitě. V obou případech jsou po ukončení centrifugace částice příslušného druhu zkoncentrovány do úzkých pruhů, které lze detekovat a izolovat stejným způsobem jako při zonální centrifugaci.

K přípravě hustotních gradientů se používají látky, které se vyznačují vysokou rozpustností. Běžně používanými látkami jsou chlorid cesný nebo sacharóza. Rozdíly hustot, které lze dosáhnout, se pohybují v rozmezí 1,0–1,3 g/ml u sacharózy a 1,0–1,9 g/ml u CsCl, což umožňuje separovat a izolovat např. buněčná jádra, mitochondrie, nukleové kyseliny atd. o vysoké čistotě.

Separace částic na základě odlišné hustoty se využívá nejen k jejich izolaci, ale může být využita rovněž k podrobnější charakterizaci. Je známo, že vznášivá hustota dvouřetězcové DNA je významně ovlivněna zastoupením jednotlivých typů párů nukleotidových bází, čehož lze využít ke stanovení podílu GC-párů v DNA. Platí, že

$$\%(G+C) = (\rho - 1,660/0,098) \times 100,$$

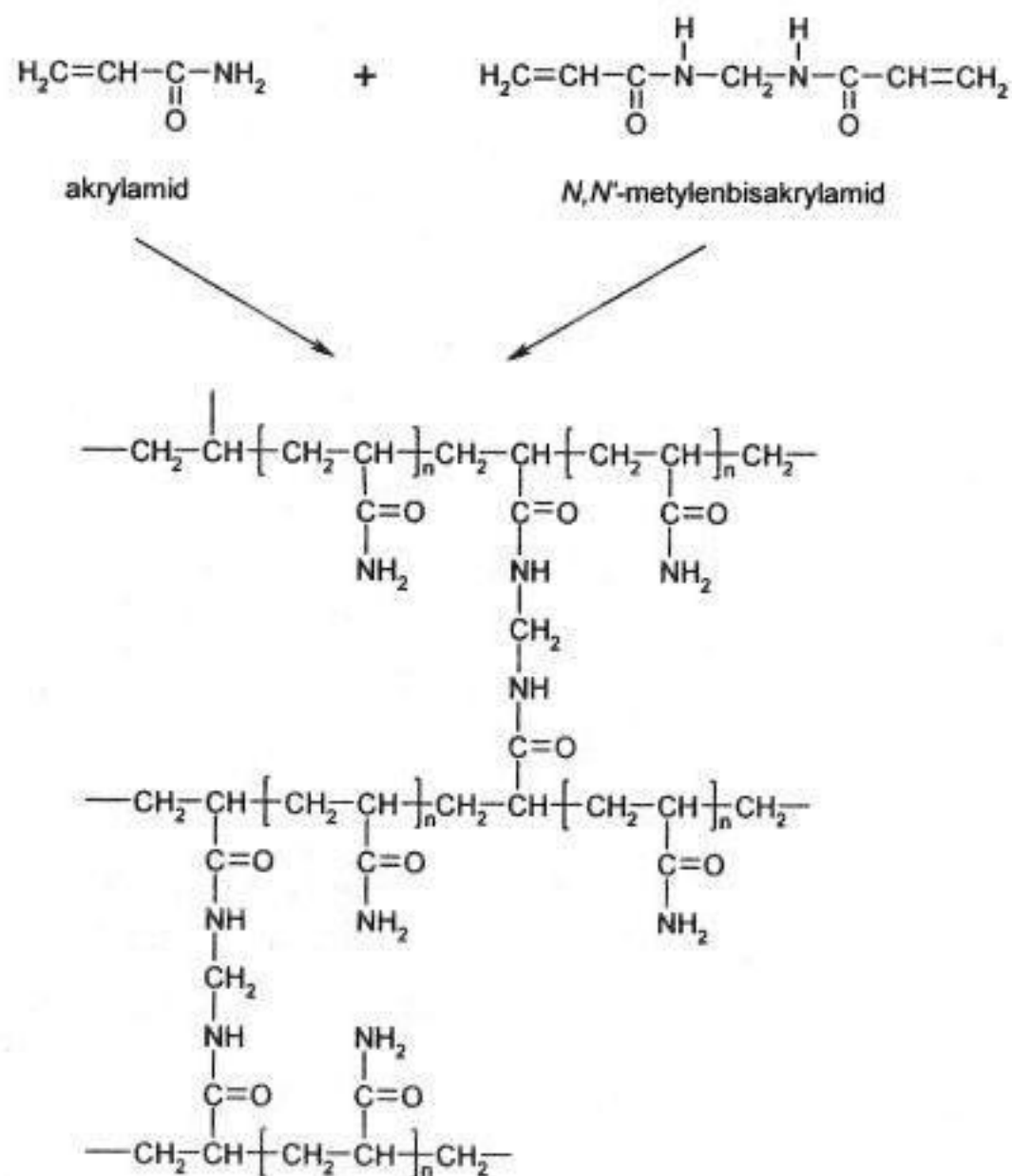
kde ρ = vznášivá hustota vzorku dvouřetězcové DNA.

Speciálním případem využití izopyknické centrifugace je separace odlišných strukturálních typů DNA v gradientech CsCl za přítomnosti etidiumbromidu. Po navázání etidiumbromidu na DNA se její vznášivá hustota významně snižuje, přičemž množství navázaného etidiumbromidu a tím i pokles hustoty DNA závisí na jejím strukturálním typu. To umožňuje vzájemně separovat a izolovat různé formy DNA, např. kovalentně uzavřené kružnice plazmidových DNA od otevřených a lineárních molekul plazmidové a chromozomové DNA.

Každý z uvedených typů centrifugačních technik lze využít jak k preparativním účelům, jejichž cílem je izolace jednotlivých složek směsi, tak i k účelům analytickým, kde je cílem stanovení vlastností zkoumaných látek, např. velikosti nebo hustoty. Hovoří se pak o preparativní a analytické centrifugaci.

3. Elektroforéza nukleových kyselin

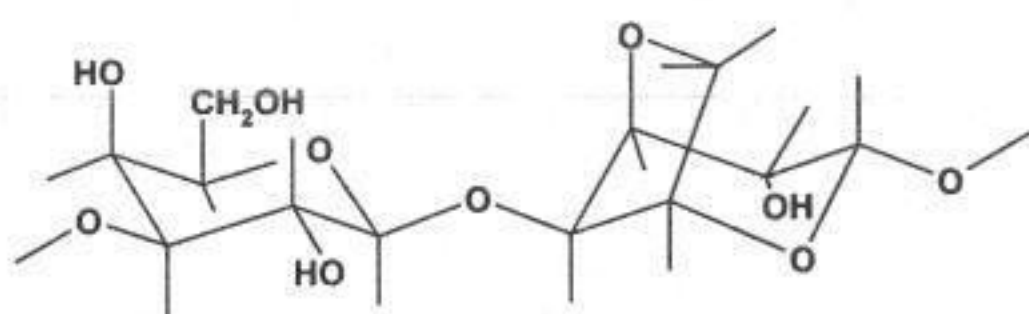
Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě.



GELOVÁ ELEKTROFORÉZA.

Z praktických důvodů se elektroforéza neprovádí přímo v roztoku, ale ve vhodném nosiči. Tím bývá obvykle gel. Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem (obr. 3) nebo agarózou (obr. 4), které vytvářejí složitou síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100 bp až po zhruba 50 kb, polyakrylamidové gely se používají pro separaci menších molekul (10 až 1000 bp). Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme horizontální a vertikální gelovou elektroforézu, které mají deskové uspořádání a dále kapilární elektroforézu, u níž je gel uvnitř kapiláry.

Obr. 3 Polyakrylamidové gely jsou tvořeny kopolymerem akrylamidu (propenamidu) a *N,N'*-metylen-bisakrylamidu



Obr. 4 Struktura agarózy. Agaróza je lineární polysacharid tvořený β -D-galaktopyránózou a 3,6-anhydro- β -L-galaktopyránózou, které jsou spojeny glykozidovými vazbami

vosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul nebo fragmentů DNA o známé velikosti, které se označují jako **standards velikosti** nebo **hmotnostní standards**. Těmi bývají většinou restriční fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž přesná velikost byla stanovena sekvencováním DNA.

Po dokončení elektroforézy je třeba identifikovat polohy separovaných molekul, které nejsou pouhým okem viditelné. Molekuly DNA lze snadno zviditelnit obarvením vhodným barvivem. Nejčastěji je používán etidiumbromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem červeně fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA. Etidiumbromid lze použít rovněž pro barvení RNA, intenzita jejího zbarvení je však nižší. Namísto etidiumbromidu může být pro barvení nukleových kyselin použita také skupina fluorescenčních kyaninových barviv s komerčním označením SYBR. Pro detekci molekul DNA separovaných v polyakrylamidových gelech se rovněž používá barvení stříbrem. Pokud jsou molekuly nukleových kyselin radioaktivně označeny, znázorní se polohy proužků na gelu autoradiograficky. K detekci poloh fragmentů DNA lze využít rovněž hybridizace se značenou sondou.

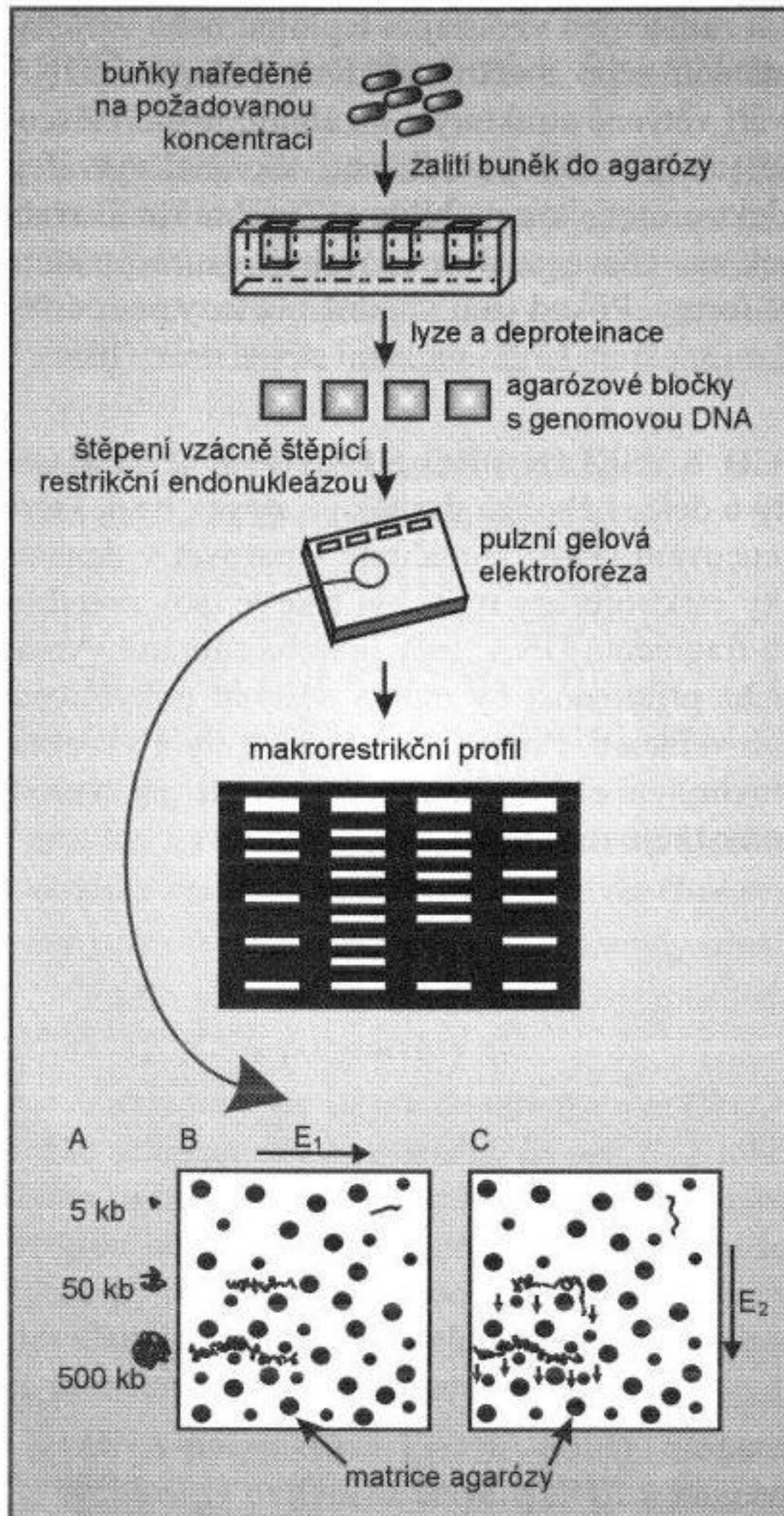
Gelová elektroforéza může být využita rovněž pro separaci a studium molekul DNA nacházejících se v různých molekulárních typech (konformacích). Lze tak odlišit kovalentně uzavřené kružnicové molekuly DNA od molekul lineárních nebo od otevřených kružnic. Nadšroubovicová (superhelikální) forma, otevřená kruhová forma a lineární forma DNA téže molekulové hmotnosti se pohybuje agarozovým gelem různou rychlostí. Relativní pohyblivost těchto tří forem závisí na podmínkách elektroforézy.

Gelová elektroforéza je rovněž vhodným prostředkem pro studium interakcí mezi nukleovými kyselinami a proteiny, zejména těmi, které se vážou na specifické sekvence DNA (transkripční faktory, represory ap.). Metoda se označuje jako **gelová zpomalovací analýza (retardační analýza, EMSA)** (str. 135). Vychází z poznatku, že elektroforetická pohyblivost DNA se po vazbě proteinů snižuje.

PULZNÍ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (PFGE). Při konvenční gelové elektroforéze se molekuly DNA pohybují přímočaře a plynule od katody k anodě a rychlost pohybu je úměrná jejich velikosti. Separace je podmíněna rychlejším průchodem menších molekul pórovitou strukturou gelu. Tento princip separace se uplatňuje u molekul DNA do velikosti přibližně 50 kb; molekuly větší velikosti se pohybují stejnou rychlostí, ale nerozdělí se, protože uvíznou v síťovité struktuře gelu. K jejich separaci se proto využívá **pulzní gelová elektroforéza**. Při PFGE je gel vystaven elektrickému poli, jehož směr se pod určitým úhlem (90 – 180°) v časových intervalech periodicky mění. Aby se molekuly DNA mohly pohybovat ve směru změněného elektrického pole, musí nejdříve změnit svou orientaci. Tento proces se

Rychlost pohybu molekul DNA v gelu označovaná jako **elektroforetická pohyblivost** je nepřímo úměrná logaritmu jejich velikosti. Při posuzování elektroforetické pohyblivosti dané molekuly DNA není třeba brát v úvahu velikost náboje, protože nukleové kyseliny mají náboj rovnoměrně rozložen a jeho velikost je na jednotku délky molekuly stejná. Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu o neznámé velikosti lze proto stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul nebo fragmentů DNA o známé velikosti, které se označují jako **standards velikosti** nebo **hmotnostní standards**. Těmi bývají většinou restriční fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž přesná velikost byla stanovena sekvencováním DNA.

nazývá **reorientace** a doba nutná k jejímu uskutečnění se označuje jako **reorientační čas**. Větší molekuly DNA spotřebují na svou reorientaci více času než molekuly menší a jejich výsledný přímočarý pohyb je proto pomalejší. Mezi rozhodující parametry při PFGE tedy patří kromě napětí, teploty a koncentrace elektroforetického pufru, které jsou významné i u konvenční elektroforézy, navíc i pulzní čas, který je možno udržovat v průběhu separace buď na konstantní úrovni nebo jej spojitě nebo nespojitě zvyšovat. Tím lze regulovat velikost molekul, které se za daných podmínek ještě pohybují, protože jejich reorientační čas je nižší než doba pulzu. Molekuly, které zvoleného limitu daného rozmezím pulzních časů nedosáhnou, zůstávají po elektroforéze nahromaděny v tzv. zóně komprese poblíž startu.



Technika pulzní elektroforézy se využívá k separaci intaktních molekul DNA (např. chromozomů bakterií nebo kvasinek) nebo restrikčních fragmentů DNA o velikosti desítek kilobází až několika megabází. Molekuly DNA, které se mají analyzovat pulzní gelovou elektroforézou, nelze izolovat standardními metodami (např. fenolovou extrakcí nebo adsorbicí na chromatografických kolonách), při kterých dochází k jejich poškození. Pro izolaci se používá speciální postup (obr. 5), který zahrnuje kultivaci buněk do přesně stanovené hustoty a jejich smíchání s roztavenou agarózou s nízkým bodem tání. Buněčná suspenze se následně přenesse do malé formičky. Lyze buněk a deproteinace DNA pak probíhá v takto vytvořených agarózových bločkách, kde je DNA chráněna před nespecifickou fragmentací střížnými silami při pipetování. Po deproteinaci je třeba bločky několikrát promýt od proteinázy, aby se předešlo degradaci restrikčních enzymů a proteinázu nevratně inhibovat použitím 0,1–0,2 mM PMSF (fenylmetylsulfonylfluoridu). Při restrikčním štěpení umožňuje agaróza dobrou difúzi enzymů k DNA a agarózové bločky s naštěpenou DNA se mohou přímo nanášet na gel. Jako hmotnostní standardy se při pulzní gelové elektroforéze používají konkatemery plazmidů, konkatemery DNA fága lambda, makrorestrikční fragmenty

Obr. 5 Schematický postup jednotlivých kroků při makrorestrikční analýze genomové DNA pulzní gelovou elektroforézou. Princip pohybu molekul v agarózovém gelu je znázorněn v dolní části obrázku: (A) Molekuly DNA o různých velikostech v prostředí bez elektrického pole. (B) Separace molekul při konvenční gelové elektroforéze (molekuly o velikosti 50–500 kb se pohybují stejnou rychlostí). (C) Při pulzní elektroforéze je elektrické pole E_1 přerušeno a nahrazeno polem E_2 v jiném směru. Aby se DNA mohla pohybovat v novém směru, musí se nejdříve reorientovat. Větší molekuly pro svou reorientaci vyžadují delší dobu a proto dochází ke zpomalení jejich pohybu gelem.

bakteriálních genomů, chromozomy kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (240–2200 Kb) a *Schizosaccharomyces pombe* (3,5–5,7 Mb), chromozomy *Dictyostelium discodium* (3,6 až 9,0 Mb) nebo chromozomy *Neurospora crassa* (4,0–10,3 Mb).

DENATURAČNÍ GRADIENTOVÁ GELOVÁ ELEKTROFORÉZA (DGGE). Rozdíly v sekvenci (např. bodové mutace) v krátkých molekulách DNA o stejné délce mohou být detekovány denaturační gradientovou gelovou elektroforézou, která využívá rozdílné elektroforetické mobility u částečně denaturované DNA a DNA v nedenaturovaném stavu. Fragmenty DNA obsahující sekvenční polymorfismus jsou obvykle připravené polymerázovou řetězovou reakcí. Vzorky DNA o velikosti 150–1200 bp se analyzují v polyakrylamidovém gelu s lineárním denaturačním gradientem zajištěným vzrůstající teplotou nebo vzrůstající koncentrací denaturačního činidla (formamidu nebo močoviny). Dvouřetězcová DNA během elektroforézy zvolna denaturuje a vytváří větvené struktury s lokálními jednořetězcovými oblastmi. Stejně dlouhé molekuly dvouřetězcové DNA s odlišnou sekvencí vytvářejí při denaturaci rozdílné struktury s odlišnou elektroforetickou mobilitou. Zvýšení rozlišovací schopnosti se dosáhne připojením GC-svorek na konce analyzovaných fragmentů, které zamezí úplné denaturaci až do jednořetězcové formy. Pokud jsou vhodně zvoleny podmínky gradientu, DGGE umožní sekvenčně specifickou separaci směsi molekul stejné délky lišících se jedinou bází.

ELEKTROFORÉZA NUKLEOVÝCH KYSELIN PRO STANOVENÍ JEJICH SEKVENCE. Jednořetězcové oligonukleotidy o délce několika desítek až stovek bází, které jsou výsledkem reakcí používaných při sekvencování DNA, lze účinně separovat v denaturačních polyakrylamidových gelech. Podmínky elektroforézy musí být takové, aby pohyblivost závisela pouze na délce jednovláknových fragmentů DNA, tedy je třeba zabránit vytváření lokálních dvouřetězcových struktur, jejichž přítomnost by mohla ovlivnit pohyblivost fragmentů a znemožnit přesné stanovení jejich velikosti. Proto se používají gely s vysokou koncentrací denaturujících látek (např. močoviny) a elektroforéza se provádí při teplotě 50–60 °C. Kombinace těchto dvou faktorů znemožňuje renaturaci.

II. Manipulace s nukleovými kyselinami

Manipulaci s purifikovanými nukleovými kyselinami podstatně usnadňuje (1) existence enzymů, které umožňují specifický zásah do jejich struktury, (2) použití vektorů, které umožňují klonování studovaných fragmentů nukleových kyselin (kapitola III), (3) využití schopnosti hybridizace jejich řetězců při identifikaci specifických nukleotidových sekvencí.

1. Enzymy používané k úpravám nukleových kyselin

ROZDĚLENÍ ENZYMŮ PODLE SUBSTRÁTOVÉ SPECIFITY. Většina metod molekulární biologie je závislá na využití enzymů, jejichž substrátem jsou nukleové kyseliny. Předností enzymových reakcí je jejich přísná specifita a možnost pracovat s velmi malým množstvím materiálu. Enzymy, používané při analýze a úpravách nukleových kyselin lze klasifikovat podle několika kritérií. Podle substrátové specifity se tyto enzymy dělí na dvě základní skupiny:

- enzymy, jejichž substrátem je DNA,
- enzymy, jejichž substrátem je RNA.

Substrátová specifita je obvykle absolutní, i když rozlišení mezi oběma druhy nukleových kyselin je podmíněno pouze přítomností nebo absencí 2'-OH skupiny ribózy.

ROZDĚLENÍ ENZYMŮ PODLE TYPU REAKCÍ. Podle typu reakcí, které katalyzují, lze enzymy obou výše uvedených skupin dále dělit na:

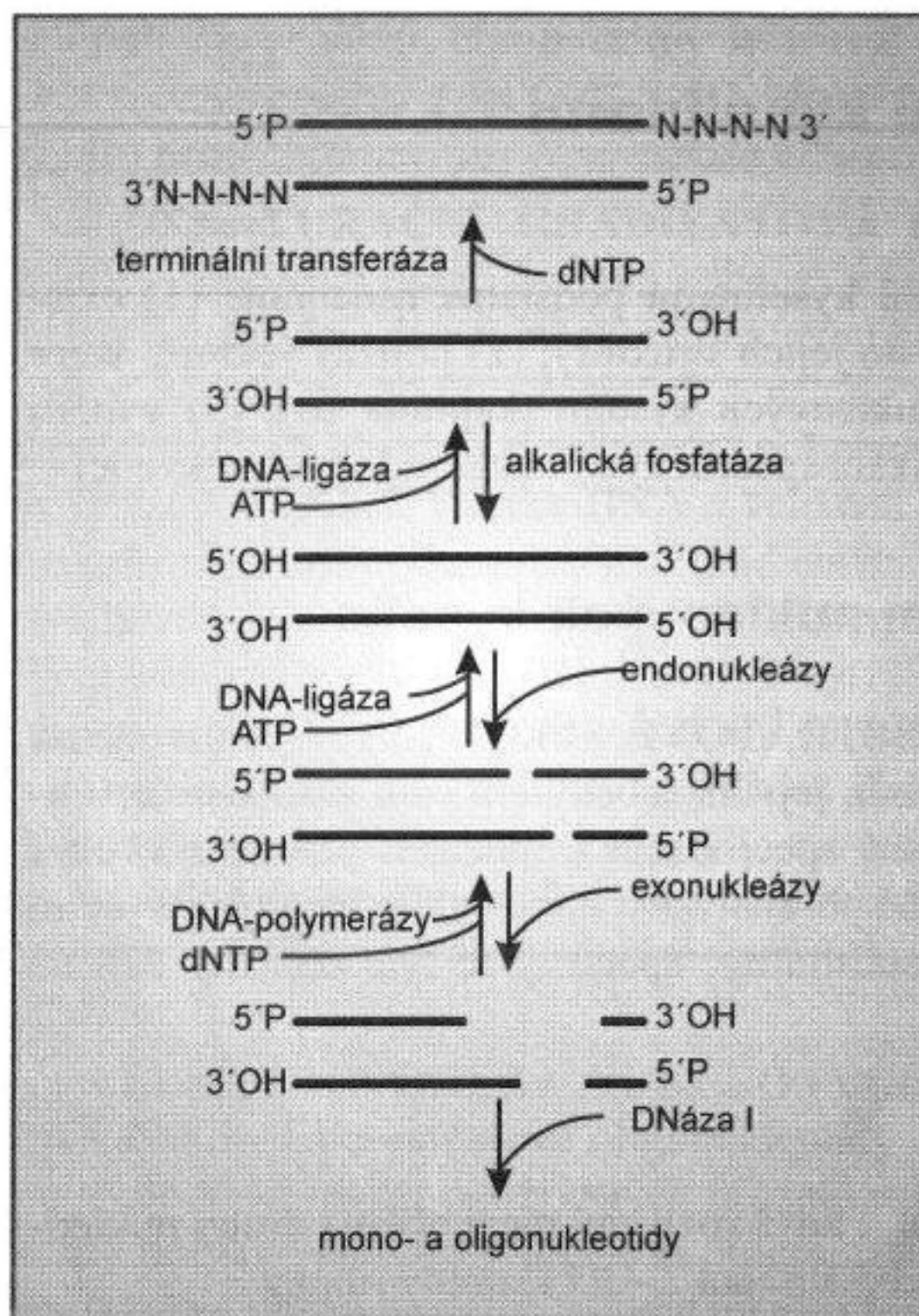
- enzymy syntetizující nukleové kyseliny (polymerázy),
- enzymy modifikující nukleové kyseliny (fosfatázy, metylázy, kinázy),
- enzymy spojující nukleotidové řetězce (ligázy),
- enzymy odbourávající nukleové kyseliny (nukleázy).

Podle substrátové specifity se enzymy jednotlivých skupin dále dělí, např. na DNA-polymerázy, RNA-polymerázy atd.

Základní typy úprav dvouřetězcové DNA zprostředkované enzymy příslušných skupin jsou schematicky znázorněny na obr. 6. Z tohoto schématu zřejmé, že molekulu DNA lze *in vitro* upravit téměř libovolně. V následujícím přehledu jsou uvedeny některé enzymy, které jsou běžně používány při analýze a úpravách nukleových kyselin *in vitro*. U každého enzymu je uveden jeho původní zdroj. Řada enzymů je v současné době získávána expresí odpovídajících kódujících sekvencí naklonovaných v jiných organizmech. Některé z nich byly upraveny metodami genového inženýrství.

DNA-polymeráza I (DNA-pol I) (*Escherichia coli*) katalyzuje tři odlišné reakce, jejichž rychlost je ovlivněna stavem DNA a koncentrací deoxyribonukleosidtrifosfátů (dNTP) v reakční směsi. Za vhodných podmínek degraduje polynukleotidový řetězec DNA ve směru 5' → 3' a současně degradovaný řetězec nahrazuje polymerační reakcí. Této vlastnosti se využívá ke značení DNA metodou tzv. posunu jednořetězcového zlomu (str. 23).

Klenowův fragment DNA-pol I (označovaný též jako Klenowův enzym, nebo velký fragment DNA-polI). Jedná se o větší ze dvou peptidových fragmentů, které vznikají při štěpení DNA-pol I subtilizinem. Klenowův fragment se vyznačuje 5' → 3' polymerázovou a 3' → 5' exonukleázovou aktivitou, postrádá však 5' → 3' exonukleázovou aktivitu. Používá se



Obr. 6 Enzymové úpravy DNA

Alkalická fosfatáza (telecí střevo, bakterie). Enzym odstraňuje fosfátové skupiny z 5'-konců DNA, RNA a oligonukleotidů. Toho se využívá při koncovém značení molekul, při němž se na defosforylovaný konec přenesou enzymem polynukleotidkinázou značené fosfáty. Odstranění fosfátových skupin na 5'-koncích se využívá také pro zvýšení frekvence vzniku rekombinantních molekul při začleňování cizorodé DNA do vektoru. Jestliže se odstraní fosfátové skupiny z konců linearizované molekuly vektoru, zabrání se jak její recirkularizaci, tak i vzniku dimerů. Kružnicová molekula se pak může vytvořit jen inzercí cizorodé DNA, která poskytne fosfátové skupiny pro vytvoření jedné fosfodiesterové vazby na každém ze spojovaných konců. Jednořetězcový zlom, který zůstává na druhém řetězci, je pak opraven reparačními mechanismy hostitelské buňky, do níž se rekombinantní molekula přenesou transformací.

T4-polynukleotidkináza (buňky *E. coli* infikované bakteriofágem T4). Enzym katalyzuje přenos terminální fosfátové skupiny z ATP na 5'-OH skupinu DNA nebo RNA. Může však katalyzovat i výměnu fosfátových skupin na 5'-konci. Obou reakcí se využívá ke značení fragmentů nukleových kyselin na 5'-koncích pomocí ^{32}P .

T4-DNA-ligáza (buňky *E. coli* infikované bakteriofágem T4). Katalyzuje tvorbu fosfodiesterové vazby mezi 5'-fosfátovou skupinou a 3'-OH skupinou sousedního nukleotidu. Používá se k vzájemnému spojení dvou molekul DNA zakončených komplementárními konci, k připojení spojek a adaptorů a cirkularizaci lineárních molekul DNA. Na rozdíl od DNA-ligázy z *E. coli*, která má podobné vlastnosti, lze pomocí tohoto enzymu spojovat i fragmenty se zarovnanými konci.

při syntéze DNA, kdy nesmí docházet k odbourávání primerů, např. při enzymové metodě sekvencování nebo při značení DNA prodloužením primeru.

Terminální deoxyribonukleotidyltransferáza (telecí brzlík). Katalyzuje připojování nukleotidů k 3'-koncům DNA. Na rozdíl od DNA-polymerázy nevyžaduje matrici ani primer. Enzym je využíván k připojování polydeoxyribonukleotidových úseků (tzv. homopolymerních konců) k fragmentům DNA a vektorovým molekulám se zarovnanými konci pro vytvoření komplementárních úseků, které umožní jejich spojení. Lze jej využít rovněž při koncovém značení nukleových kyselin.

Zpětná transkriptáza (retroviry, např. virus ptačí myeloblastózy). Je využíván především k přípravě cDNA z mRNA. Zpětných transkriptů se využívá též k sekvencování RNA a jako sond pro hybridizaci.

Endonukleázy se dělí na sekvenčně specifické (restrikční endonukleázy), které štěpí v místech výskytu určitých sekvencí, a sekvenčně nespecifické, štěpící náhodně.

Exonukleáza III (*E. coli*). Tento enzym působí ve směru 3' → 5' a na dvouřetězcové DNA odstraňuje od jejího 3'-konce jedno vlákno. Působí pouze na DNA, jejíž konce mají přesahující 5'-konec nebo jsou zarovnaný, jednořetězce s přesahujícím 3'-koncem nejsou štěpeny. Lze ji proto s výhodou využít k vytváření jednosměrných delecí. Druhý řetězec je pak odstraněn nukleázou S1.

Exonukleáza Bal31 (*Alteromonas espejiana*). Štěpí lineární dvouřetězcovou DNA od obou konců za vzniku zkrácených fragmentů DNA se zarovnanými konci. Je používána k přípravě obousměrných delecí nebo k průkazu koncové lokalizace určité sekvence na chromozomu.

Nukleáza S1 (*Aspergillus oryzae*). Je endonukleáza specifická pro jednořetězcovou DNA. Používá se k odstraňování jednořetězcových úseků na dsDNA, smyček na cDNA vznikajících při její syntéze, mapování intronů analýzou hybridních molekul DNA-mRNA. Po štěpení S1-nukleázou jsou konce DNA často heterogenní a chybějící úseky musí být zaplněny polymerázou.

Deoxyribonukleázy a ribonukleázy. DNáza I (hovězí pankreas). Vytváří na DNA jednořetězcové zlomy, od nichž pak DNA dále degraduje na mono- a oligonukleotidy. Není sekvenčně specifická. Za přítomnosti Mg^{2+} vytváří na obou řetězcích náhodné zlomy, za přítomnosti Mn^{2+} dochází ke vzniku zlomů v protilehlých místech. Limitované štěpení nízkými koncentracemi enzymu umožňuje zavádět do DNA jednotlivé zlomy, které lze využít např. pro značení DNA nebo zavádění mutací. Ve větších koncentracích se používá k odstranění DNA při izolaci RNA. Mezi RNázami existuje řada sekvenčně specifických enzymů (např. ribonukleáza T1), které se využívají při analýze a sekvencování RNA. K odstranění RNA z roztoků DNA je používána **ribonukleáza A** z hovězího pankreatu.

RESTRIKČNÍ ENDONUKLEÁZY. Restrikční endonukleázy jsou sekvenčně specifické endonukleázy, produkované kmeny většiny bakteriálních druhů. Jejich přirozenou funkcí je degradace cizorodé DNA, která se do bakteriálních buněk dostává např. při infekci bakteriofágem. V současné době je charakterizováno několik typů restrikčních enzymů, z nichž nejvýznamnější jsou restrikční endonukleázy II. typu (II. třídy). Uvedená charakteristika se proto bude týkat těchto enzymů.

Rozpoznávací (cílové) místo restrikčních enzymů je tvořeno krátkou, obvykle 4 až 8 nukleotidovou sekvencí dvouřetězcových molekul DNA, která má velmi často charakter palindromů. K rozštěpení molekuly DNA dochází hydrolýzou fosfodiesterových vazeb obou řetězců v **restrikčním místě** neboli **místě štěpení**, které se nachází uvnitř rozpoznávacího místa nebo těsně vedle něho. Produktem štěpení jsou úseky DNA o definované délce označované jako **restrikční fragmenty**. V závislosti na způsobu, jakým je místo štěpení rozštěpeno, vznikají restrikční fragmenty, které mohou být zakončeny:

- tupými (zarovnanými) konci,
- 5'-jednořetězcovými přesahujícími konci,
- 3'-jednořetězcovými přesahujícími konci.

V současné době je známo více než 3 500 restrikčních endonukleáz II. typu rozpoznávajících zhruba 160 různých sekvencí. Restrikční endonukleázy se stejným rozpoznávacím místem se označují jako **izoschizomery**; štěpení DNA však může probíhat v odlišných místech, případně se mohou lišit citlivostí k metylaci.

Názvy restrikčních endonukleáz jsou odvozeny z počátečního písmene rodového a prvních dvou písmen druhového jména organismu, z něhož byly izolovány. V některých

případech je součástí názvu i zkrácené označení konkrétního kmene nebo sérotypu příslušného organismu. Pokud určitý kmen produkuje dvě nebo více různých restričních endonukleáz, odlišují se navzájem římskými číslicemi. Příklady některých restričních enzymů jsou uvedeny v tabulce 1. Některé restriční endonukleázy se vyznačují tzv. **relaxovanou (uvolněnou) specifitou** (tzv. hvězdičkovou aktivitou), která se projevuje schopností enzymu štěpit za určitých reakčních podmínek blízké příbuzné sekvence. Příkladem enzymu s touto vlastností je *EcoRI*, která může vedle sekvence GAATTC štěpit i sekvence GGATTC, GGATTT a AGATTT.

Další důležitou charakteristikou restričních endonukleáz je jejich **citlivost k metylaci bází** v rozpoznávacím místě. Izoschizomerů, které se vzájemně liší v citlivosti k metylaci, lze s výhodou využít např. při studiu metylace nukleotidových sekvencí.

Tabulka 1 Příklady některých restričních endonukleáz II. třídy

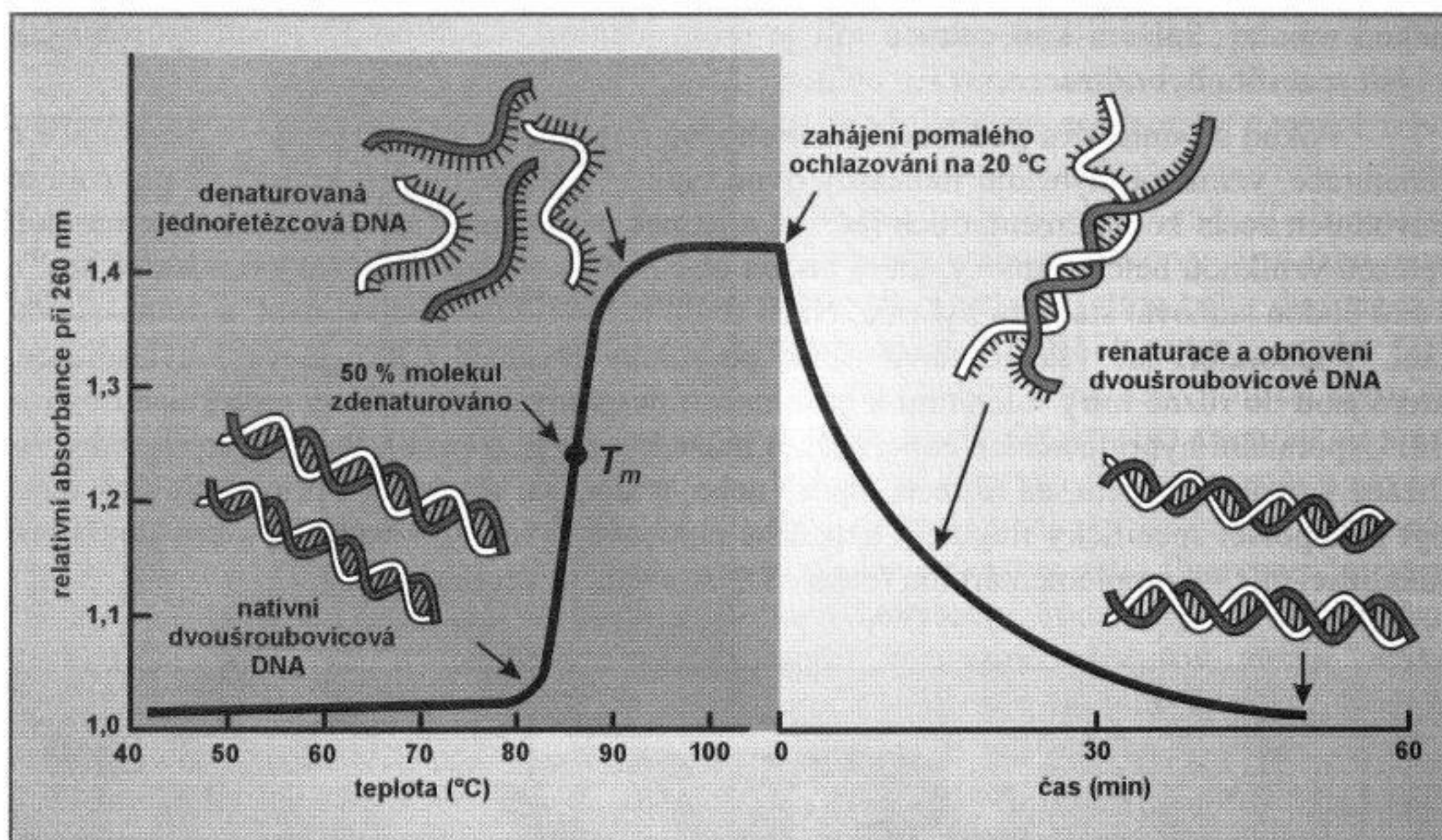
Označení enzymu	Producent enzymu	Rozpoznávací místo na sekvenci DNA
		5' → 3' 3' ← 5'
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	GG↓CC CC↑GG
<i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i> RY13	G↓AATTC CTTAA↑G
<i>Sau3AI</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> 3A	↓GATC CTAG↑
<i>PstI</i>	<i>Providentia stuartii</i>	CTGCA↓G G↑ACGTC
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CCC↓GGG GGG↑CCC

Pozn.: Místa štěpení jsou vyznačena svislými šipkami.

2. Hybridizace nukleových kyselin

Jako hybridizaci nukleových kyselin označujeme proces vytváření dvouřetězcových molekul z jednořetězců DNA nebo RNA za předpokladu, že se jejich sekvence vyznačují úplnou nebo částečnou komplementaritou bází (na rozdíl od renaturace však nedochází ke spojování jednořetězců, které původně byly součástí téže molekuly). Této schopnosti je široce využíváno k vyhledávání a charakterizaci specifických nukleotidových sekvencí v genových knihovnách, v cytologických preparátech, při mapování genomu atd.

Principem hybridizace je odlišná pevnost kovalentních vazeb cukr-fosfátové kostry řetězce DNA a mnohem slabších vodíkových můstků, které vážou oba řetězce dvoušroubovice DNA prostřednictvím párováním bází. Proto je možné nastavit takové podmínky, při kterých se oba řetězce oddělí, ale neohrozí stabilitu kovalentních vazeb žádného z nich. Tento proces se označuje jako **denaturace** DNA a na rozdíl od denaturace většiny proteinů je reverzibilní. Vzhledem k existenci komplementarity bází je možné řetězce opět spojit a **renaturovat**. Denuraci DNA lze snadno vyvolat zahřátím a proto se tento proces rovněž často označuje jako tání a to dokonce i když je vyvolán jinými způsoby – např. enzymaticky (DNA-polymerázou) nebo chemicky (NaOH) (obr. 7). Změny v uspořádání řetězců při



Obr. 7 Změny absorbance roztoku DNA při teplotní denaturaci a renaturaci postupným ochlazováním

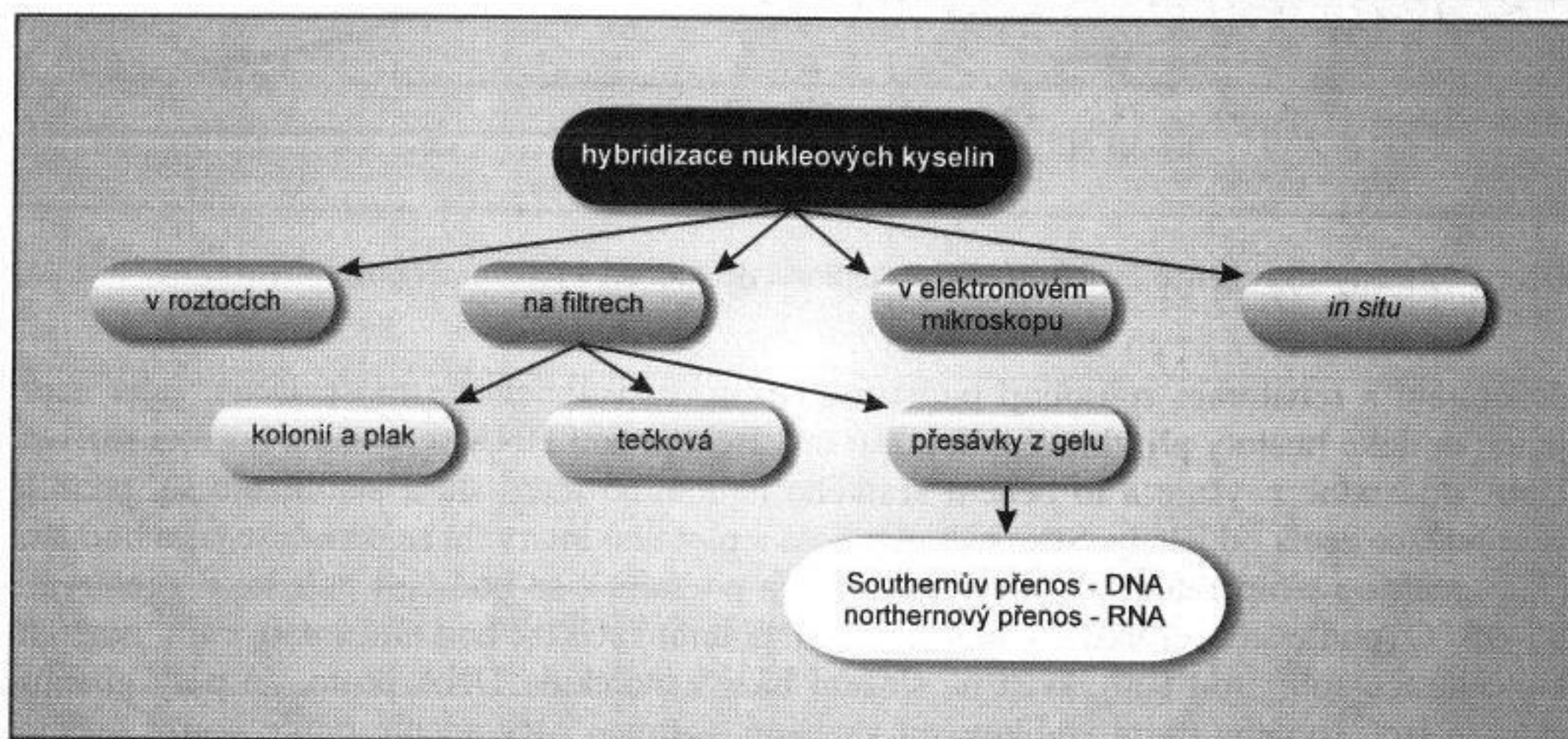
denaturaci a renaturaci způsobují podstatné změny fyzikálních vlastností DNA, jako např. jejich optické hustoty při vlnové délce 260 nm. Během tání DNA se optická hustota roztoku DNA podstatně zvyšuje a to během krátkého teplotního intervalu a stabilizuje se, jakmile jsou řetězce zcela odděleny. Střední bod tohoto teplotního intervalu se označuje jako bod tání (T_m , „melting temperature“). Za fyziologických podmínek se bod tání pohybuje v intervalu 85–95 °C (podle složení bází). V laboratorních podmínkách lze bod tání snížit, např. změnou koncentrace solí. Bod tání závisí na složení bází v molekule DNA proto, že páry guanin-cytozin jsou spojeny třemi vodíkovými vazbami, zatímco páry adenin-tymin pouze dvěma. Proto je podle bodu tání možné odhadnout složení bází dané DNA a naopak podle známého složení DNA lze odhadnout její teplotu tání.

Kromě vodíkových vazeb je dvouřetězcová struktura DNA stabilizována hydrofobními interakcemi a to mezi bázemi protějších řetězců dvoušroubovice i mezi bázemi téhož řetězce. Hydrofobní povaha bází způsobuje, že v jednořetězcové podobě, při které jsou vystaveny vodnému prostředí, jsou báze nestabilní. Vzájemné párování umožňuje bázím omezit interakci s okolním vodným prostředím. Hydrofobní interakce jsou relativně nespecifické a proto mají řetězce nukleových kyselin tendenci se k sobě přibližovat i bez specifického párování bází. Specifitu interakcí lze zvýšit chemickými látkami, které hydrofobní interakce snižují (např. formamidem). Jednořetězcové molekuly nukleových kyselin (např. RNA) omezují interakci bází s vodným prostředím tvorbou sekundárních struktur. Proto se tyto molekuly často skládají do sekundárních struktur s částečně dvouřetězcovými úseky.

Dalším faktorem, který se uplatňuje při hybridizaci nukleových kyselin je existence negativního náboje fosfátových skupin. Elektrostatické síly plynoucí z odpuzování stejně nabitých cukr-fosfátových koster dvou řetězců proto působí proti vodíkovým vazbám a hydrofobním interakcím. Za přítomnosti solí, které molekuly DNA obklopují a neutralizují negativní náboj fosfátových skupin, je však míra odpuzování řetězců podstatně omezena. Pokud je koncentrace solí snížena, bude každá slabá interakce mezi řetězcí znemožněna elektrosta-

tickou repulzí. Snížení koncentrace solí je proto jedním z často používaných způsobů jak zvýšit specifitu hybridizace.

Pokud se smísí dva podobné, ale ne shodné fragmenty DNA, provede se denaturace a renaturace, vzniknou hybridní molekuly dvou typů: jednak se obnoví komplexy párováním původních zcela komplementárních řetězců a jednak párováním částečně komplementárních řetězců vzniknou heteroduplexy, které budou obsahovat nespárované úseky („mismatches“), které budou snižovat stabilitu hybridu. Nižší stabilita hybridu se projeví např. snížením bodu tání. V laboratoři lze však nastavit různé podmínky přísnosti („stringence“) hybridizace, které jsou do různé míry tolerantní k přítomnosti nespárovaných úseků v molekulách hybridů. Uspořádání hybridizačních experimentů může být různé (obr. 8). Provádí se např. hybridizace v roztoku, v gelu, na filtrech, čípech nebo *in situ*. Ve všech třech případech však musí být k dispozici specifický fragment označené nukleové kyseliny, tzv. sonda, která slouží pro lokalizaci cíle – komplementárního řetězce DNA v daném vzorku.

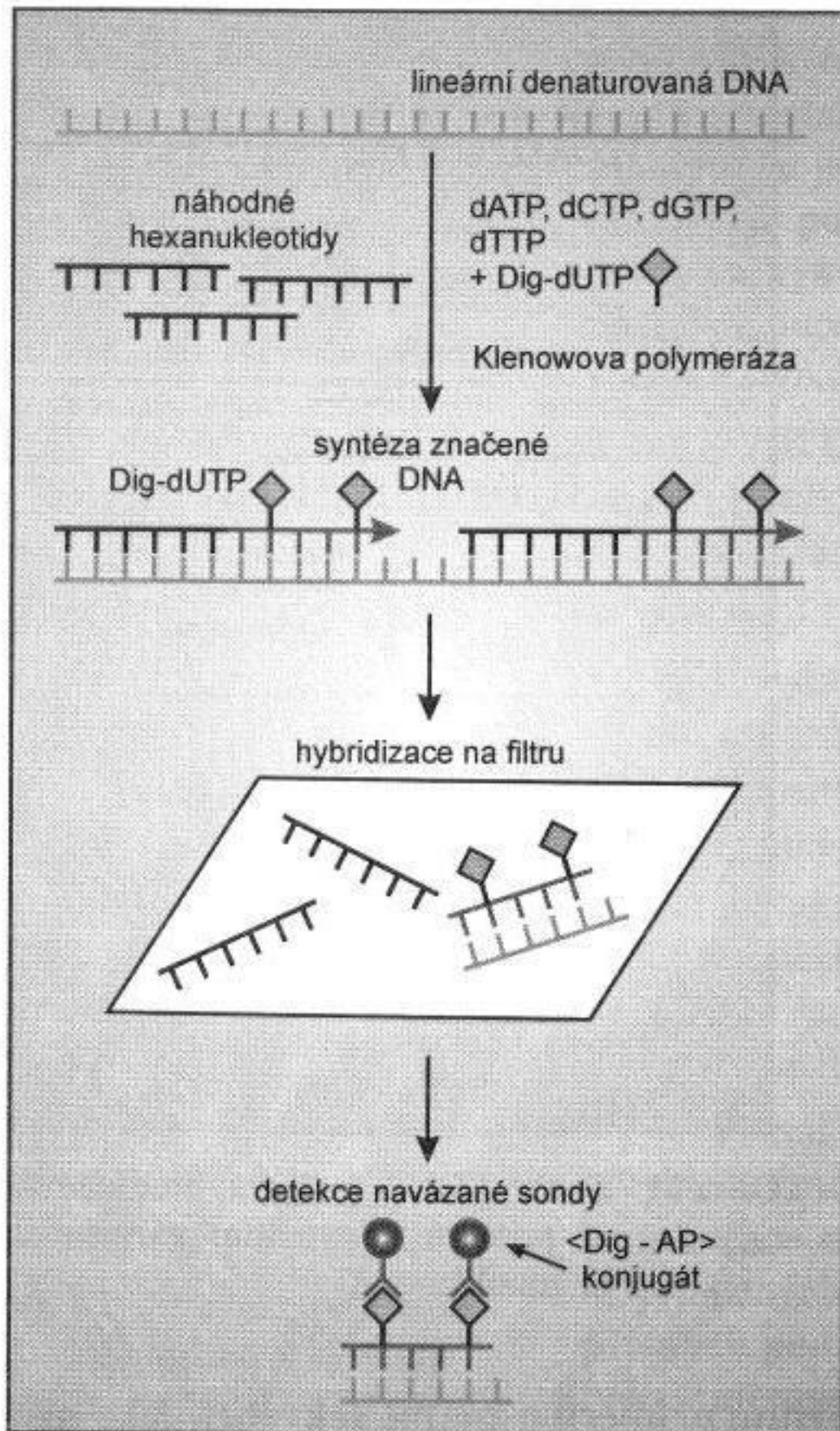


Obr. 8 Možnosti experimentálního provedení hybridizace nukleových kyselin

PŘÍPRAVA SONDY. Výchozím krokem pro hybridizaci je příprava molekulární nebo též **hybridizační sondy**. Molekulární sondy jsou jednořetězcové, radioaktivně nebo chemicky značené nukleotidové sekvence DNA nebo RNA. Vážou se na cílovou sekvenci, kterou lze pak podle značky sondy snadno identifikovat. Jako sondu lze použít jakoukoliv vhodně označenou molekulu DNA nebo RNA. Nejčastěji se pro jejich přípravu používají:

- sekvence genomové DNA nebo cDNA klonované ve vektoru nebo amplifikované polymerázovou řetězovou reakcí,
- uměle syntetizované oligonukleotidy o délce 15–70 bází. Jejich sekvence bývá často odvozena ze sekvence aminokyselin proteinu, jehož kódující oblast na DNA vyhledáváme,
- sekvence genů příbuzných organismů, u nichž existuje vysoká pravděpodobnost, že připravená sonda rozezná rovněž sekvenci homologních genů.

PRINCIP ZNAČENÍ SOND A JEJICH DETEKCE. Při radioaktivním značení jsou do sekvence sondy začleněny nukleotidy, obsahující některý z radioaktivních izotopů, nejčastěji ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S nebo ^3H . Signálem sondy je radioaktivní záření, které lze detekovat např. autoradiograficky na vrstvě fotografického filmu, papíru nebo emulze.



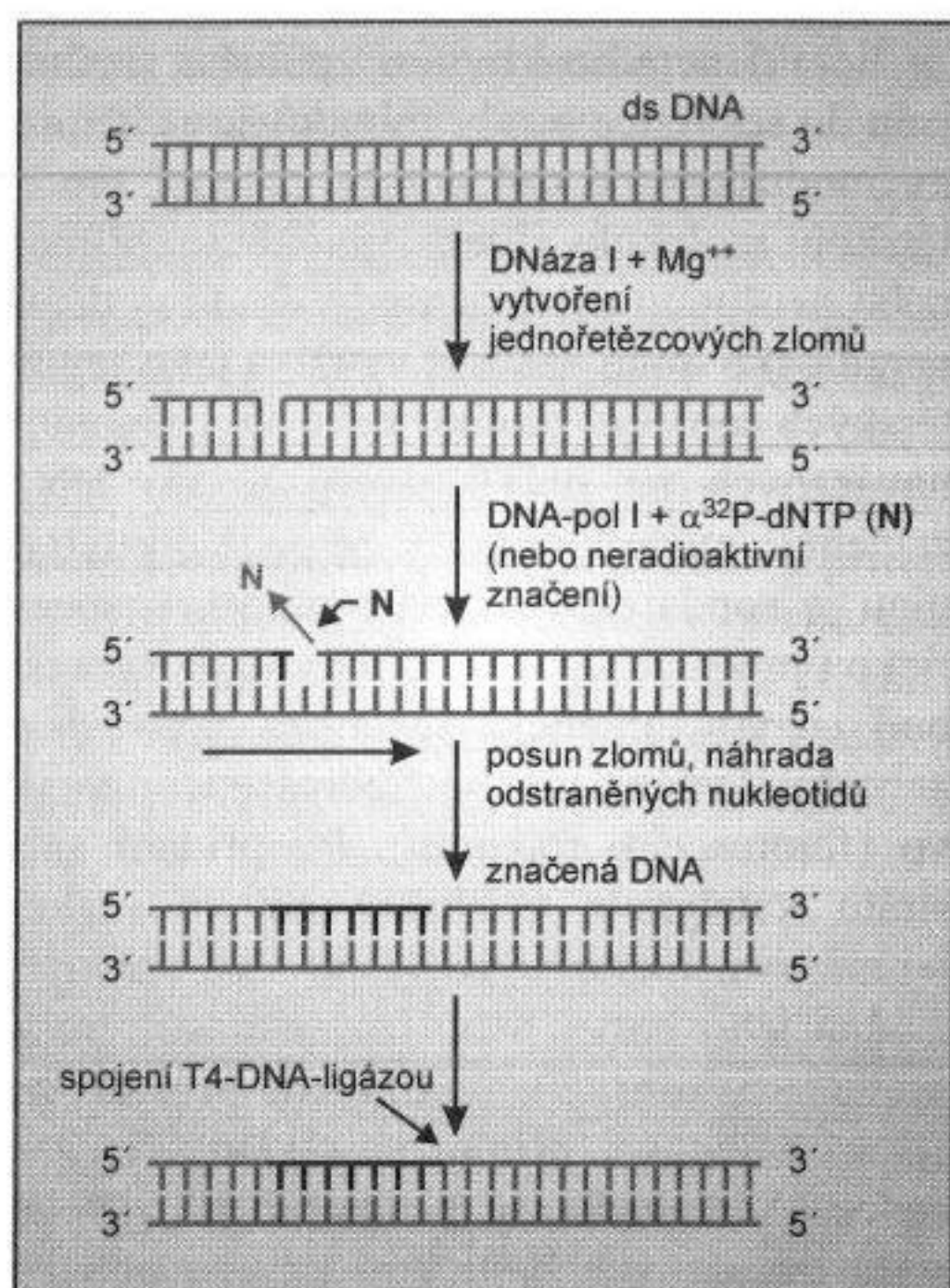
Obr. 9 Neradioaktivní značení nukleových kyselin digoxigeninem a jejich použití jako sond

METODY ZNAČENÍ SOND. Sondy se značí buď po celé délce nebo na jejím konci značenými nukleotidy, které se přidávají do reakční směsi. Nejčastěji jsou používány následující metody:

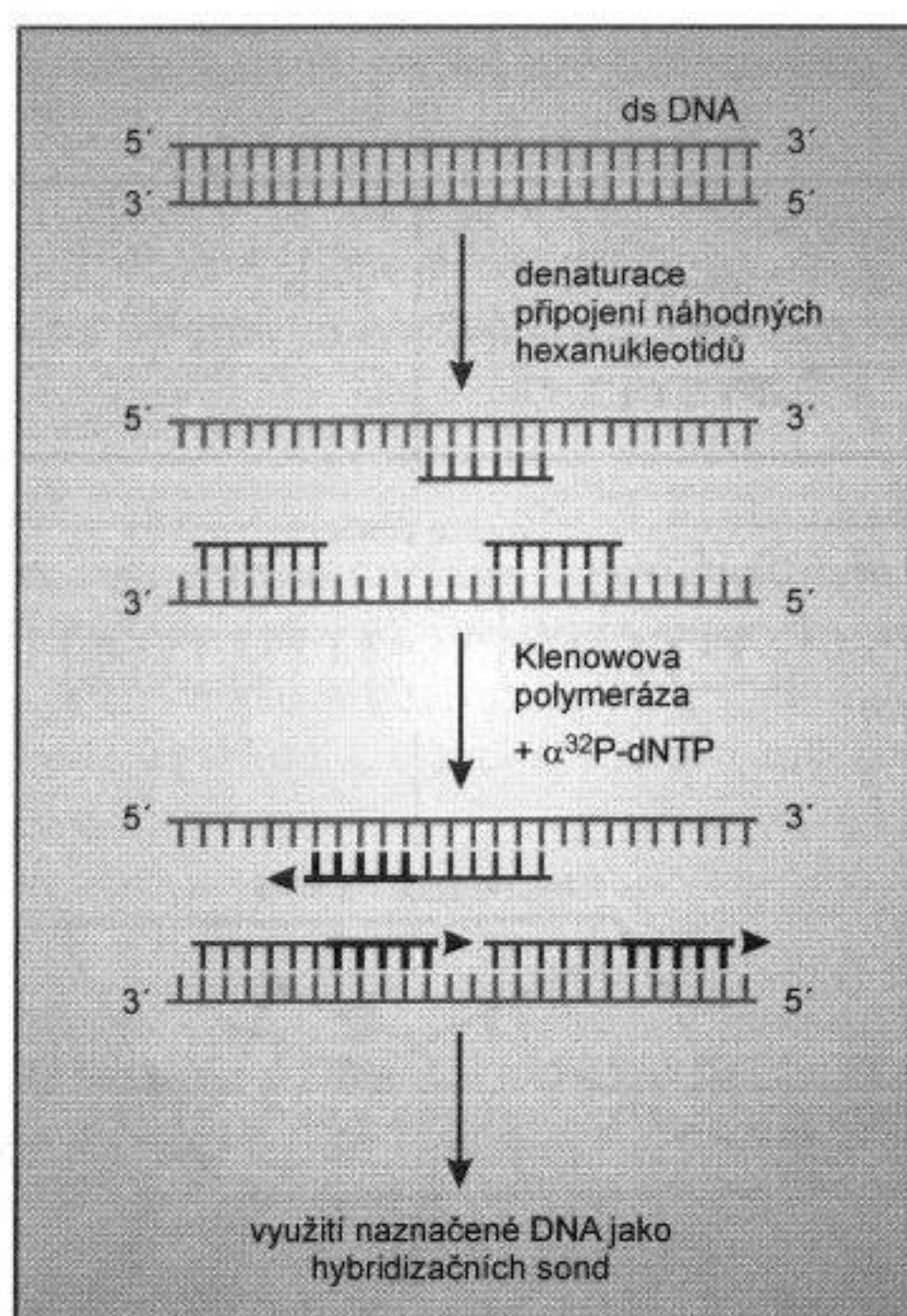
1. Metoda posunu jednořetězcového zlomu („nick translation“) (obr. 10). Na dvouřetězcové DNA se vytvoří DNázou I náhodné jednořetězcové zlomy. Ty jsou substrátem pro působení DNA-polymerázy I, která odstraňuje svou exonukleázovou aktivitou nukleotidy od místa zlomu ve směru 5'→3' a současně ve stejném směru připojuje nukleotidy k 3'-konci zlomu.

2. Metoda prodlužování primeru (obr. 11), při níž je výchozí molekula DNA denaturována a k jednořetězcům se přidá směs synteticky připravených oligonukleotidů, jejichž sekvence je náhodná. Tyto oligonukleotidy se proto připojují k různým místům jednořetězců a uplatní se jako primery pro syntézu komplementárního řetězce DNA-polymerázou. Aby se zabránilo odbourávání primerů je třeba pro polymerační reakci zvolit takovou DNA polymerázu, která postrádá 5' → 3' exonukleázovou aktivitu. Z toho důvodu se nejčastěji využívá Klenowův fragment DNA-pol I nebo zpětná transkriptáza.

Při neradioaktivním způsobu značení jsou do sekvence sondy zabudovány chemicky modifikované nukleotidy nesoucí reportérskou molekulu, která umožňuje přímou nebo nepřímou detekci sondy. Řada systémů neradioaktivního značení využívá jako reportérských molekul biotinu nebo digoxigeninu navázaných na dUTP, který se do DNA začleňuje místo tyminu. V případě digoxigeninu je sonda detekována protilátkou specifickou pro digoxigenin, na kterou je navázán buď enzym (alkalická fosfatáza, peroxidáza nebo luciferáza), a nebo fluorescenční barvivo (fluorescein, rodamin). Po přidání substrátu katalyzuje příslušný enzym reakci, jejímž výsledkem je podle povahy substrátu změna jeho barvy nebo rozpustnosti, emise světla atd. (obr. 9). V druhém případě lze sondu detekovat přímo na základě fluorescence. Analogicky se postupuje při detekci sond označených biotinem, kdy se používá buď protilátka proti biotinu, častěji však avidin nebo streptavidin, které k němu vykazují vyšší afinitu. Způsob detekce je shodný jako u sond značených digoxigeninem.



Obr. 10 Značení DNA posunem jednořetězcového zlomu



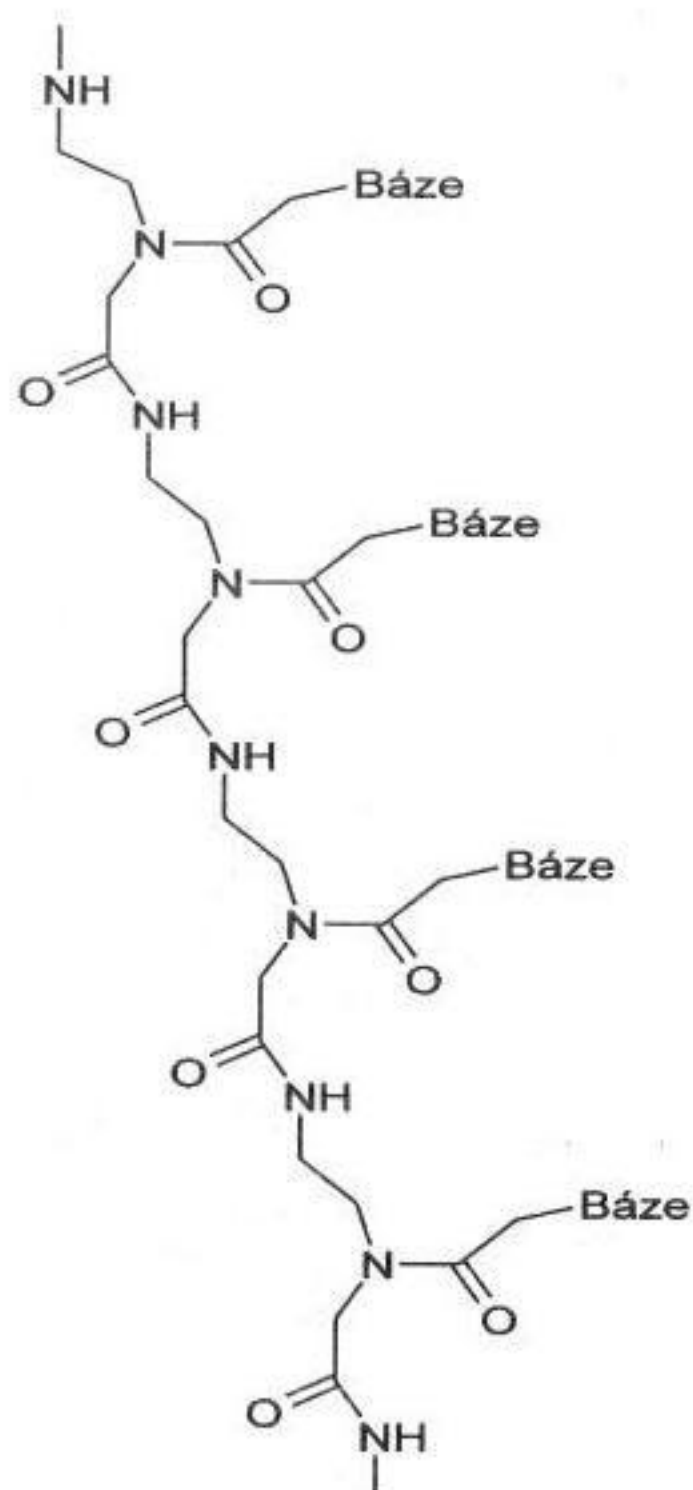
Obr. 11 Značení DNA metodou prodlužování primerů s využitím náhodných oligonukleotidů

3. Polymerázová řetězová reakce s využitím primerů o známé sekvenci. Jako matrice slouží naklonované fragmenty DNA nebo celková genomová DNA. Polymerázovou řetězovou reakcí tak lze získat sondu z přesně definovaného úseku DNA, vymezeného místy připojení primerů. K polymeraci se používá *Taq* DNA-polymeráza.

4. Značení transkripce *in vitro*, při níž se jako sonda použije RNA-transkript dané sekvence DNA, vzniklý za přítomnosti ribonukleotidů.

5. Koncové značení řetězců DNA, které se používá zejména pro značení synteticky připravených oligonukleotidů nebo restrikčních fragmentů. 5'-konce DNA se nejčastěji značí radioaktivním fosfátem prostřednictvím polynukleotidkinázy. 3'-konce DNA lze označit metodou doplnění konců, kdy jsou k přesahujícím jednořetězcům na koncích fragmentů vytvořených působením restrikčních enzymů dosyntetizovány DNA-polymerázou komplementární označené nukleotidy. Druhý způsob je založen na působení terminální transferázy, která k 3'-koncům připojí značené nukleotidy.

6. Pro přípravu hybridizačních sond může být použita také peptidová nukleová kyselina (PNA), tj. uměle připravená molekula analogická deoxyribonukleové kyselině, jejíž kostru tvoří opakující se N-(2-aminoethyl)-glycinové jednotky spojené peptidovou vazbou. Purinové a pyrimidinové báze se na kostru vážou metylen-karbonylovými vazbami (obr. 12). PNA napodobuje chování DNA a při hybridizaci s komplementární DNA nebo RNA se řídí Watson-Crickovými pravidly o párování bází. Protože pseudopeptidová kostra PNA nese na rozdíl od cukr-fosfátové kostry DNA neutrální náboj, sondy z ní připravené mají řadu vhodných vlastností jako je vysoká specifita, afinita k DNA a rychlý průběh hybridizace. Tento typ sondy umožňuje účinnou hybridizaci i s cílovými sekvencemi, vyznačujícími se složitou sekundární strukturou nebo v podmínkách *in situ*. Interakce PNA:DNA je více selektivní než



Obr. 12 Struktura peptidové nukleové kyseliny

DNA:DNA nebo RNA:RNA a může ji i při nízké teplotě (20 °C) destabilizovat pouhý jeden chybný pár bází. Sondy tohoto typu jsou proto vhodné také pro detekci jednonukleotidových polymorfizmů. Sondy jsou zpravidla značeny asymetrickým kyaninovým barvivem, které po vazbě sondy na DNA fluoreskuje až 50× intenzivněji než u nenavázané sondy a signál je proto viditelný i pouhým okem.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ STABILITU HYBRIDŮ. Vznik hybridních molekul a jejich stabilita je ovlivněna celou řadou faktorů, k nimž patří zejména:

- teplota,
- délka hybridizujících molekul,
- stupeň vzájemné komplementarity bází,
- zastoupení GC a AT párů,
- koncentrace solí v roztoku,
- pH roztoku,
- přítomnost látek destabilizujících vodíkové vazby mezi řetězci (např. některá denaturační činidla, jako je formamid nebo močovina).

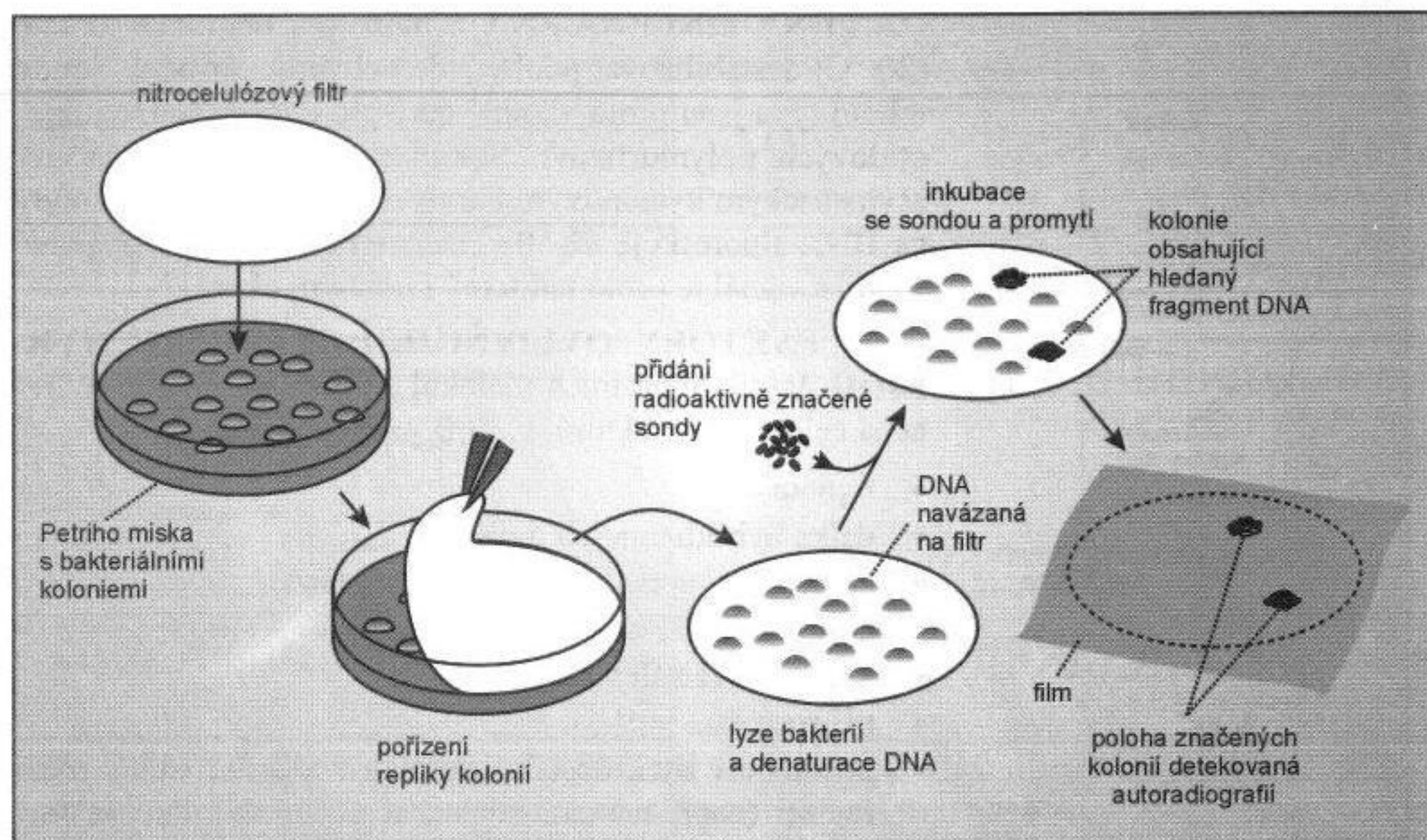
Pokud není sekvence sondy plně komplementární k vyhledávané sekvenci (např. při použití sondy odvozené ze sekvence aminokyselin v proteinech nebo při vyhledávání příbuzných sekvencí), provádí se hybridizace za **málo přísných podmínek**. Těch se dosáhne např. snížením teploty hybridizace na hodnoty pohybující se přibližně 40 °C pod

hodnotou T_m . Naopak **přísné podmínky** umožňují vytvoření duplexů z jednořetězců, jejichž sekvence jsou zcela komplementární nebo mají vysoký stupeň podobnosti. Teplota, při níž hybridizace probíhá, se pohybuje kolem hodnoty o 5 °C nižší než je T_m . Tvorba dvouřetězců je ovlivněna rovněž tím, zda vzájemně hybridizují molekuly DNA nebo RNA. Stabilita hybridů klesá v pořadí: RNA-RNA, RNA-DNA, DNA-DNA.

Hybridizační reakce nukleových kyselin se provádějí (1) v roztoku, (2) na pevných podkladech, (3) v preparátech chromozomů, buněk a tkání (*in situ*).

HYBRIDIZACE NA PEVNÝCH PODKLADECH je v současné době jednou z nejčastěji používaných variant hybridizačních technik. Denaturovaná DNA nebo RNA se přenáší na pevný podklad, kterým je obvykle nitrocelulósový filtr nebo nylonová membrána. Podle způsobu přenosu nukleových kyselin rozlišujeme tři základní typy hybridizace na pevných podkladech:

- **hybridizaci kolonií nebo plak** (obr. 13), kdy se na membránu přenáší nukleové kyseliny bezprostředně uvolněné z bakteriálních kolonií nebo plak bakteriofágů vyrostlých na živných médiích, např. agarových plotnách,
- **tečkovou (kapkovou) hybridizaci**, při níž je vzorek testované nukleové kyseliny na membránu nanášen ve formě roztoku (kapek),
- **zpětnou (reverzní) hybridizaci**, při níž je soubor neznačených sond imobilizován na pevném podkladu, k nimž hybridizuje vzorek obsahující testovanou značenou DNA,



Obr. 13 Hybridizace kolonií pro vyhledání klonu obsahujícího specifický fragment klonované DNA

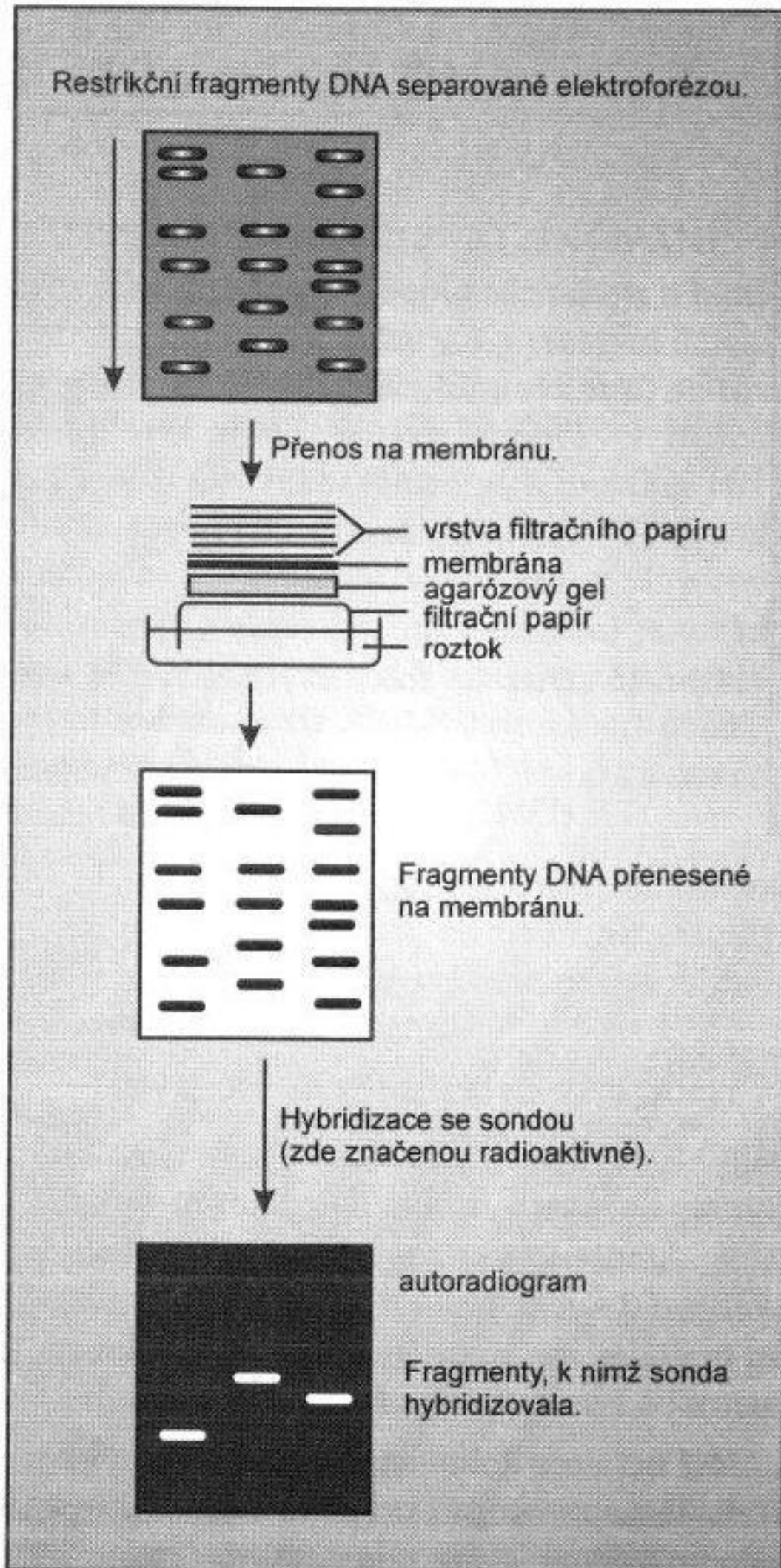
- **přenos po elektroforetické separaci** nukleových kyselin v agarózových nebo polyakrylamidových gelech. Podle toho, jakým způsobem k přenosu dochází, rozlišujeme:
 1. Kapilární přenos, při němž jsou nukleové kyseliny unášeny pufrem prostupujícím gelem a hybridizační membránou. Pohyb pufru je zajištěn kapilárními silami, které vyvolá savý materiál navrstvený na membránu (obr. 14).
 2. Elektroforetický přenos podmíněný vlivem elektrického pole. Používá se zejména při přenosu nukleových kyselin a proteinů z polyakrylamidových gelů.
 3. Vakuový přenos, kdy je gel položen na membránu umístěnou na pórovité podložce a přelit roztokem, který je pak nasáván pumpou. Výhodou tohoto způsobu je zejména rychlost přenosu.

Ve všech případech jsou nukleové kyseliny zachyceny na membráně v místech, odpovídajících jejich polohám v gelu po elektroforéze. Podobně lze přenášet rovněž proteiny. Podle typu přenášených molekul se proto rozlišuje:

- **přenos DNA** neboli **Southernův přenos** (podle E. M. Southerna, který zavedl kapilární přenos), obr. 14,
- **přenos RNA** neboli **northernový přenos** (název je slovní hříčka použitá jako protiklad k přenosu DNA),
- **přenos proteinů** neboli **westernový přenos** (název je opět slovní hříčka analogická předchozí).

Po přenosu jsou nukleové kyseliny ireverzibilně navázány na membránu ve stavu jednořetězců přístupných sondě. Další postup hybridizace se sondou je jednotný a zahrnuje následující kroky:

- prehybridizaci, při níž se přidávkem vhodných látek (heterologní DNA, tRNA, proteiny) obsadí volná místa na membráně a zabrání tak nespecifickému navázání sondy,
- vlastní hybridizaci, k níž dochází po ponoření membrány do roztoku obsahujícího jednořetězcovou sondu. Nastavením teploty lze navodit přísné nebo méně přísné podmínky,



Obr. 14 Hybridizace restrikčních fragmentů DNA přenesených na membránu (Southernův přenos)

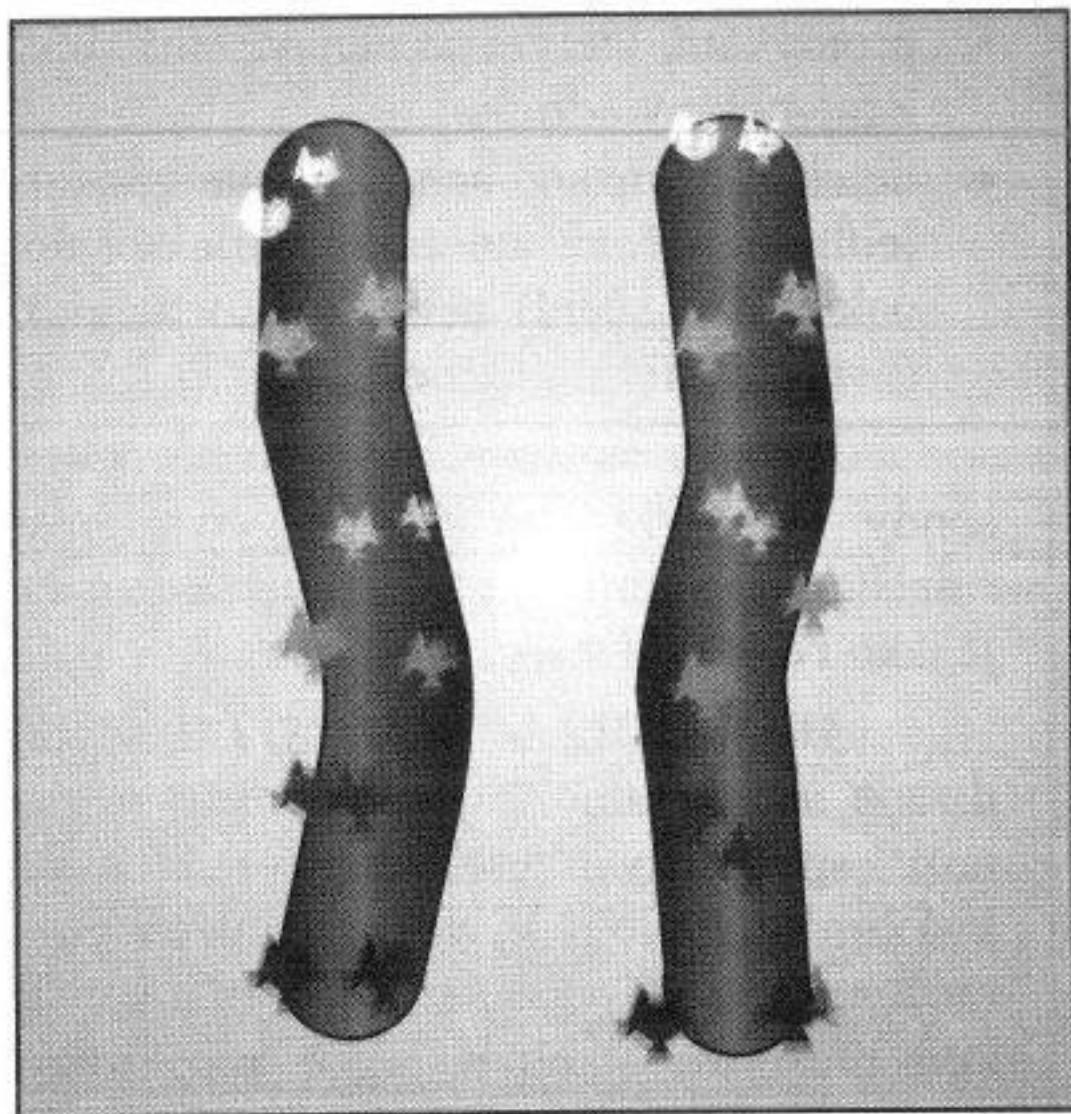
zornění dalších morfologických struktur se preparát obarví běžnými barvivy používanými v cytologii.

- promývání, kterým se nenavázaná sonda z membrány odmyje,
- detekce navázané sondy, podle způsobu jejího označení: autoradiograficky (radioaktivní značení) nebo imunochemicky (neradioaktivní značení).

Vzorky na membráně lze po odmytí sondy podrobit opakované hybridizaci s dalšími sondami. Tento postup se označuje jako **rehybridizace**.

HYBRIDIZACE IN SITU. Hybridizace *in situ* umožňuje detekovat přítomnost specifických sekvencí nukleových kyselin v cytologických preparátech chromozomů, buněk nebo řezech tkání a s vysokou přesností stanovit jejich prostorovou lokalizaci. Metoda je používána pro detekci genů DNA na polyténních chromozomech hmyzu nebo metafázních chromozomech savců a rostlin a pro detekci specifických molekul RNA uvnitř buněk a tkání.

Původně byly sondy pro hybridizaci *in situ* značeny radioaktivně a jejich detekce byla prováděna autoradiograficky. V současné době převládá chemické značení sond a jejich detekce se provádí fluorescenčně značenou protilátkou nebo jsou sondy přímo značeny fluorescenčně značenými nukleotidy. Tato metoda se označuje jako **fluorescenční hybridizace in situ (FISH)**. Vizualizace navázaných sond se provádí fluorescenční mikroskopií. Použitím sekvencně specifických sond označených různými fluoreskujícími látkami lze např. na jednom chromozomu identifikovat polohy několika genů současně (obr. 15). K zná-



Obr. 15 Detekce specifických sekvencí DNA na metafázních chromozomech metodou fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH)

III. Klonování DNA

TERMINOLOGIE KLONOVÁNÍ. Jako **klonování** se obecně označuje proces tvorby klonů. **Klon** je soubor identických buněk (příp. organismů) odvozených ze společného předka mitózou u eukaryot a prostým dělením u prokaryot. **Klonováním DNA (klonováním genů, molekulárním klonováním)** se rozumí tvorba klonů DNA. **Klon DNA** nebo též **molekulární klon** je soubor identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA, připravených např. množением rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo polymerázovou řetězovou reakcí (kapitola VI) *in vitro*. Jako **rekombinantní molekula DNA** se označuje molekula DNA vytvořená *in vitro* spojením cizorodé DNA s klonovacím vektorem. **Klonovacím vektorem (přenašečem)** je molekula DNA, která má schopnost přijmout cizorodou DNA, spojit se s ní a autonomně se replikovat v hostitelské buňce. **Cizorodou DNA** je jakýkoliv úsek DNA vložený do klonovacího vektoru. Jelikož se cizorodá DNA vkládá do klonovacího vektoru za účelem jejího klonování, označuje se též jako **klonovaná DNA** nebo též jako **inzert**.

Klonování DNA patří ke stěžejním metodám molekulární biologie. Jeho hlavní přínos spočívá především v tom, že umožňuje izolovat z komplexního genomu jeho dílčí úseky (např. geny), ty ve formě rekombinantních molekul mnohonásobně zmnožit a zpřístupnit je tak studiu dalšími metodami.

Hlavní oblasti využití klonování jsou:

- izolace genů, studium jejich struktury a funkce,
- studium regulačních oblastí, které řídí expresi genů,
- fyzikální a genetická analýza genomů,
- exprese cizích genů v nepříbuzných hostitelích (**heterologní exprese**) a získávání jejich produktů ve větším měřítku; zde je cílem připravit látky, které by mohly být využitelné v průmyslu (enzymy), zdravotnictví a farmacii (hormony, krevní faktory, vakcíny) aj.

Příprava rekombinantních molekul DNA a klonování DNA je základem **genového inženýrství**, které se zabývá přípravou umělých (nepřirozených) kombinací genů nebo vytvářením pozměněných nebo zcela nových genů a jejich zaváděním do genomu organismů s cílem rekonstruovat (upravit nebo doplnit) jejich genetickou výbavu. Lze tak připravit **transgenní organizmy**, obsahující cizorodé geny a vyznačující se novými vlastnostmi (např. rostliny odolné vůči hmyzům a virovým škůdcům nebo herbicidům, mikroorganismy produkující pozměněné proteiny a průmyslově významné látky).

Klonování zahrnuje tři základní kroky:

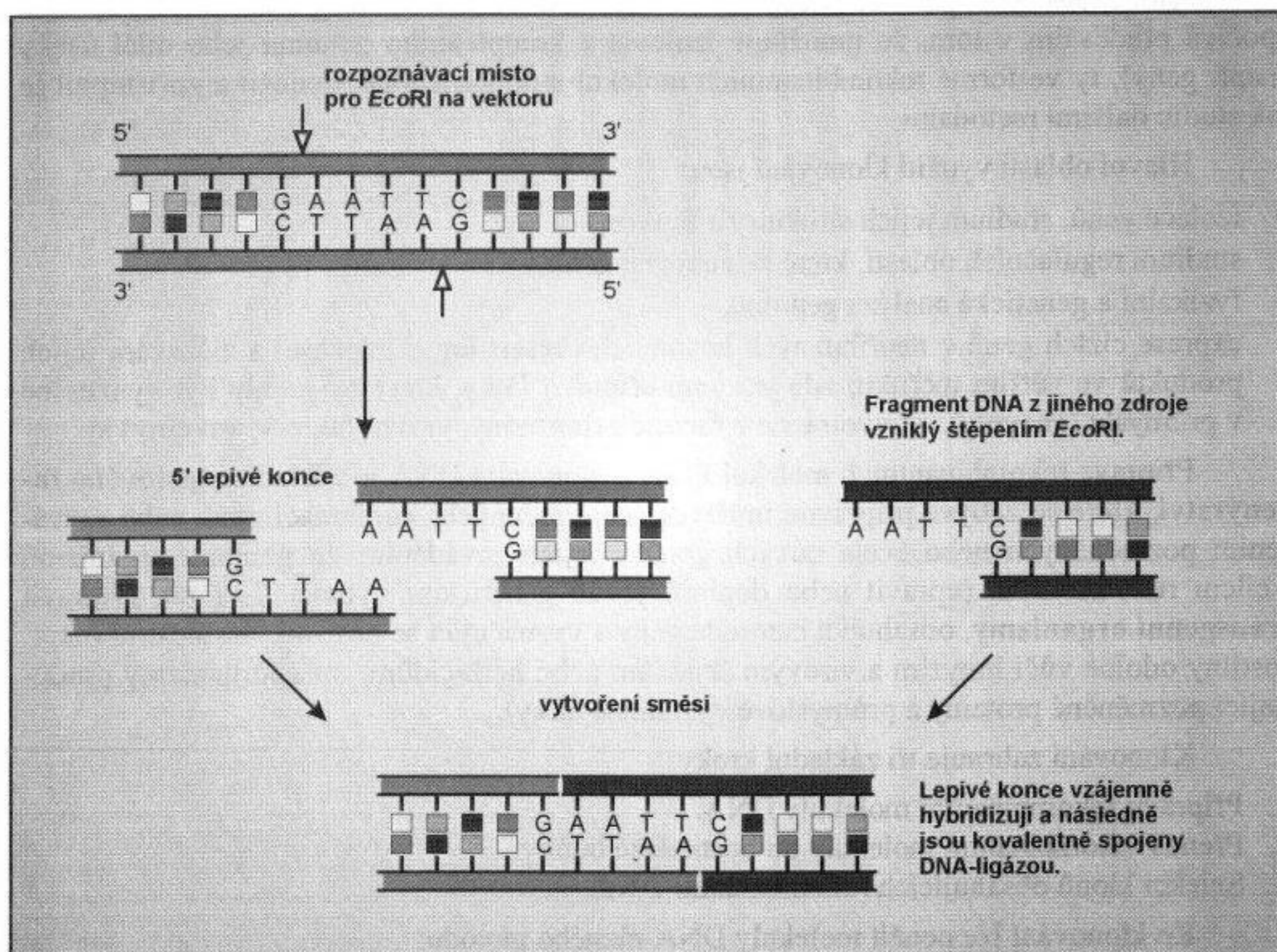
1. Přípravu rekombinantní molekuly DNA.
2. Přenos rekombinantní molekuly do hostitelské buňky.
3. Selekcí klonů obsahujících rekombinantní DNA.

Ke klonování lze použít molekuly DNA různého původu:

- genomovou DNA izolovanou z donorového organismu,
- komplementární DNA (cDNA) připravenou zpětnou transkripcí z mRNA,
- DNA připravenou uměle chemickou syntézou,
- molekuly DNA připravené polymerázovou řetězovou reakcí.

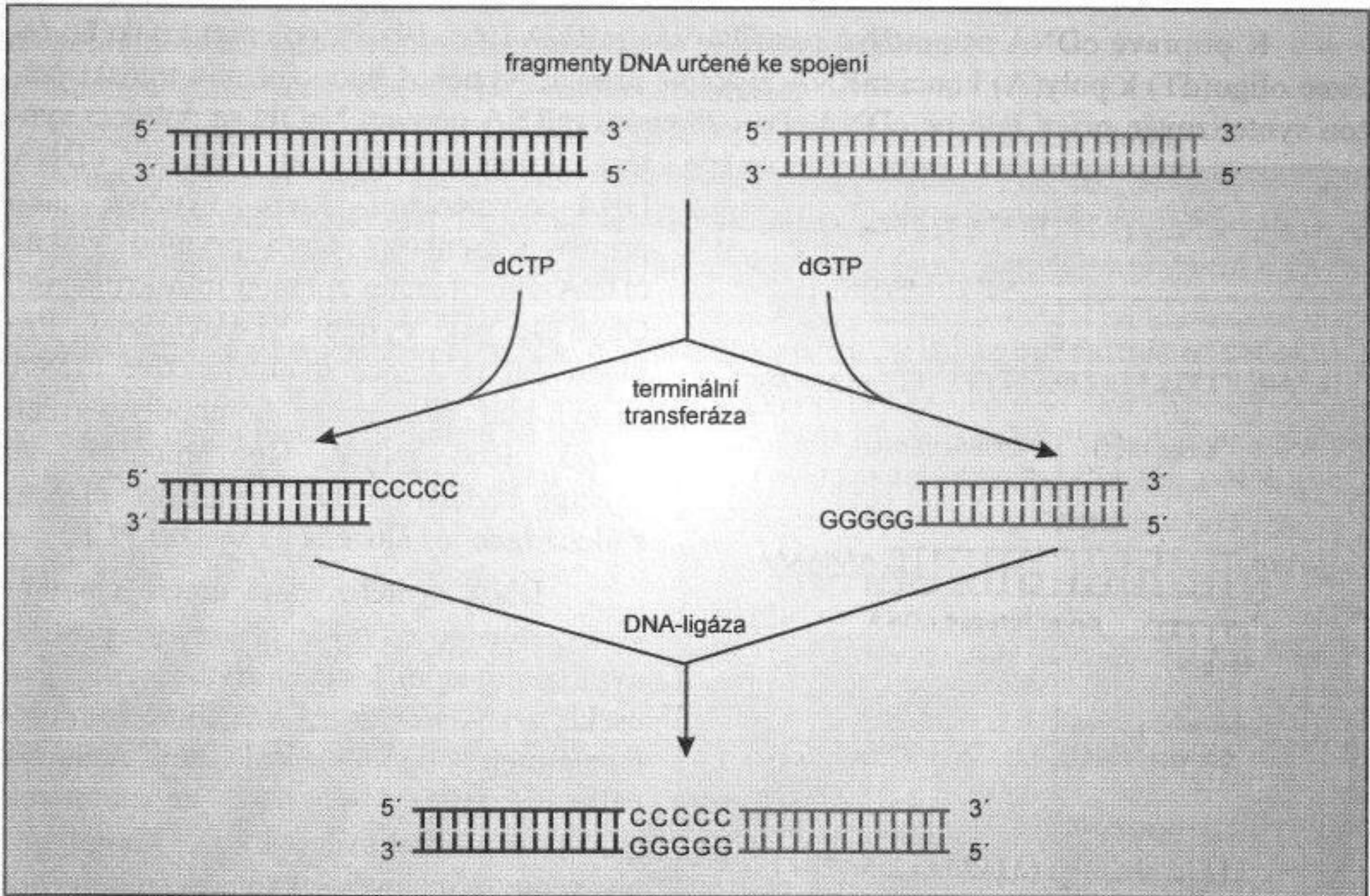
Aby mohla být cizorodá DNA začleněna do klonovacího vektoru, je třeba každý z uvedených typů molekul DNA vhodně upravit. Genomová DNA se nejdříve štěpí restriktázou nebo mechanickým stříháním na kratší fragmenty, jejichž velikost musí vyhovovat klonovací kapacitě použitého vektoru. Předpokladem účinného spojení fragmentu s vektorovou DNA je vzájemná komplementarita jejich konců. Té lze dosáhnout:

- štěpením genomové a vektorové DNA restriktivní endonukleázou, která vytváří komplementární (lepivé neboli kohezni) konce (obr. 16),
- úpravou konců molekul vektoru a fragmentu připojením homopolymerních, vzájemně komplementárních konců terminální transferázou (obr. 17),
- připojením spojky k zarovnaným koncům molekul DNA (obr. 18). **Spojky** („linkery“) jsou krátké uměle připravené oligonukleotidy, které obsahují jedno nebo více restriktivních míst pro restriktivní endonukleázy. Po jejich připojení ke koncům fragmentu DNA a štěpení restriktivní endonukleázou se vytvoří lepivé (kohezni) konce. Podobnou funkci mají **adaptory**, což jsou uměle syntetizované oligonukleotidy s předem připravenými kohezními konci, které jsou komplementární ke koncům vytvořeným určitou restriktázou. Pro úplnost je třeba dodat, že T4 DNA ligázou lze vzájemně spojit i zarovnané konce DNA, ale účinnost je za těchto podmínek snížena.

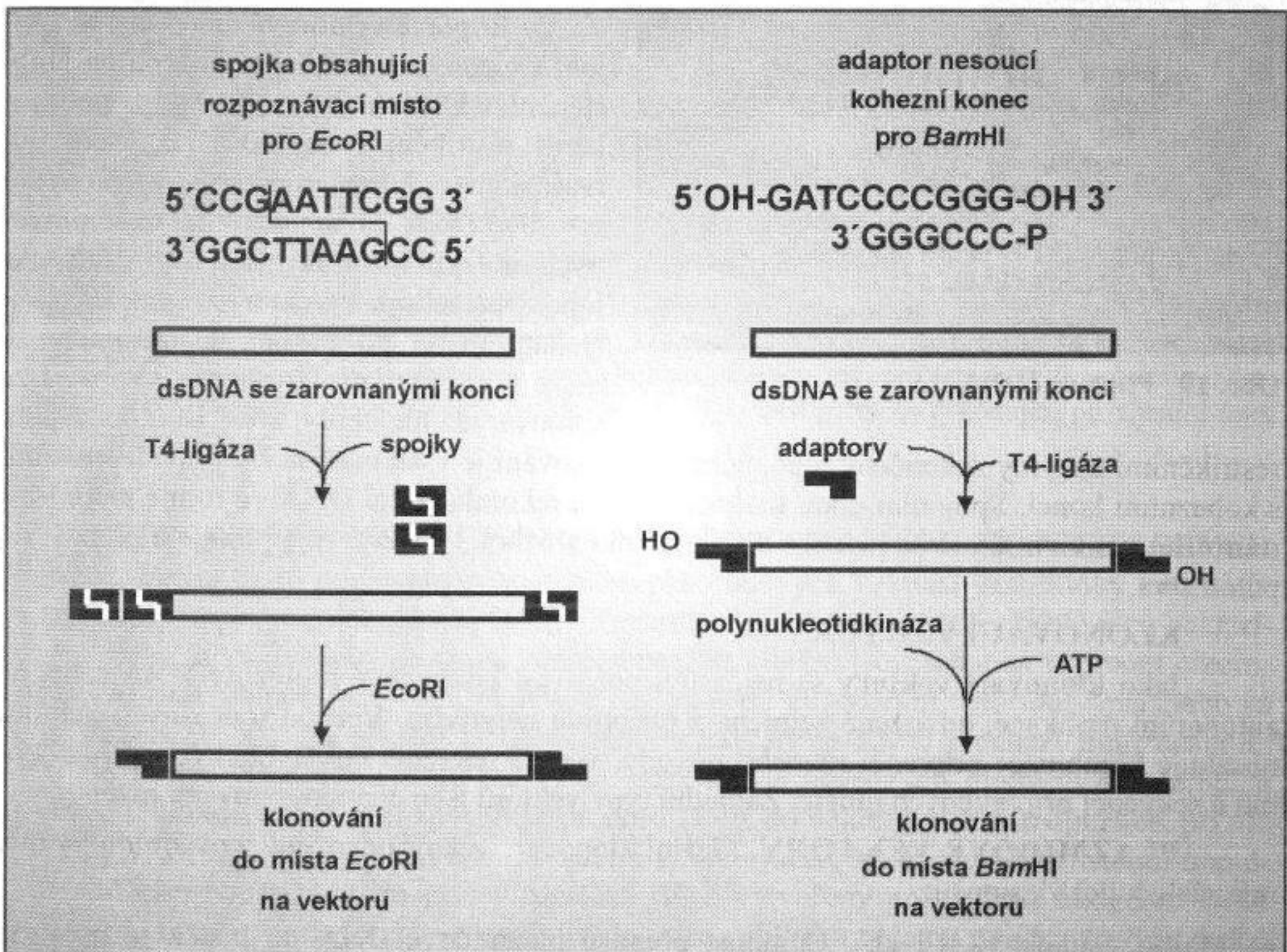


Obr. 16 Spojování fragmentů DNA s lepivými konci

KLONOVÁNÍ DNA

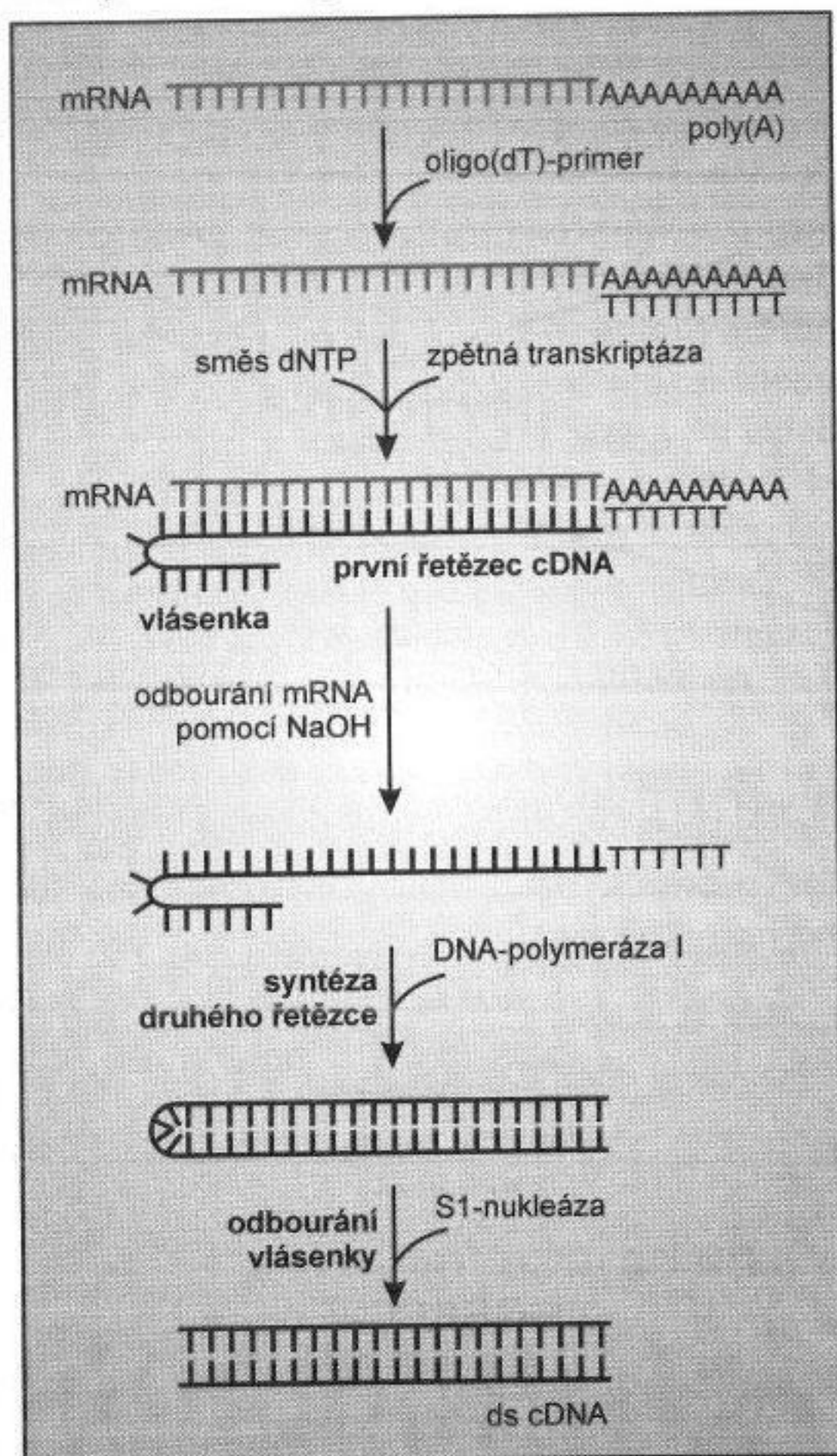


Obr. 17 Spojování fragmentů DNA pomocí homopolymerních konců



Obr. 18 Spojování fragmentů DNA pomocí spojek a adaptorů

K přípravě cDNA se používá purifikovaná mRNA (obr. 19). Připojením krátkého řetězce oligo(dT) k poly(A) konci mRNA získáme primer, od něhož bude zpětnou transkriptázou syntetizován první řetězec cDNA. Po odbourání mRNA pomocí NaOH se dokončí syntéza komplementárního řetězce cDNA DNA-polymerázou, která využívá jako primer vlásenkový ohyb prvního vlákna cDNA vytvořeného zpětnou transkriptázou. Ohyb se pak vyštěpí S1-nukleázou. Pro klonování se konce dvouřetězcové cDNA upraví buď připojením homopolymerních konců, nebo spojek. Upozorňujeme, že existují i další postupy přípravy cDNA, z nichž řada je založena na využití PCR.



Obr. 19 Příprava cDNA

restrikčními enzymy zakončeny tupě, účinnost spojování je však nižší než v případě molekul s kohezními konci. Spojením obou molekul vzniká rekombinantní DNA ve formě **rekombinantního vektoru**, která se přenese do vhodného hostitele, v němž se replikuje a přenáší do potomstva.

KLONOVACÍ VEKTORY

Jako **klonovací vektory** se nejčastěji používají kružnicové molekuly DNA schopné autonomní replikace, odvozené zejména z plazmidů nebo virů. Většina současných vektorů obsahuje kombinace sekvencí různého původu, včetně sekvencí eukaryotických chromozomů a sekvencí připravených uměle. Základní typy vektorů jsou charakterizovány níže.

PLAZMIDOVÉ VEKTORY. Ideální klonovací vektor odvozený z plazmidu by měl mít následující vlastnosti:

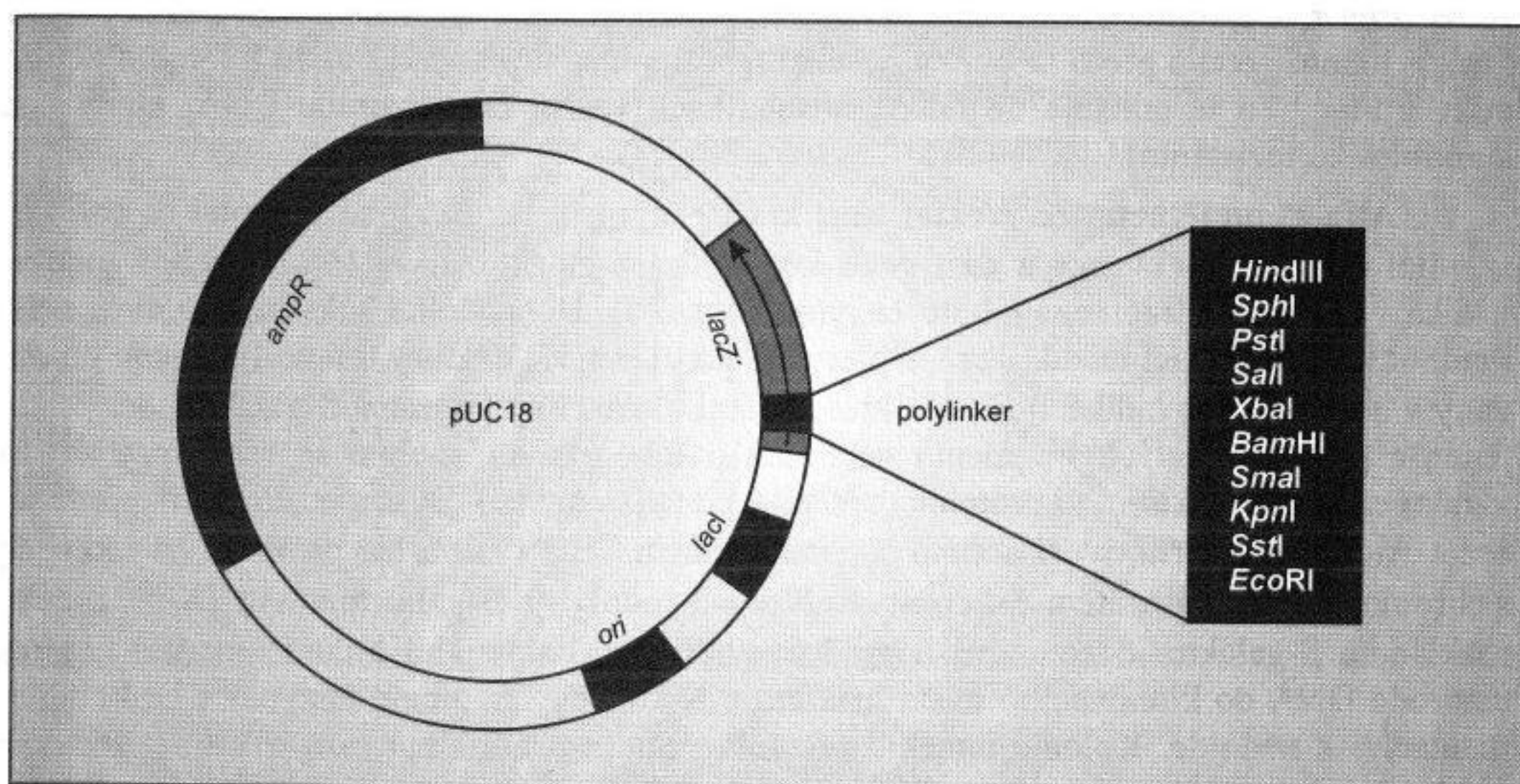
- Malou velikost (2–15 kb). Účinnost přenosu plazmidové DNA do buněk je nepřímo úměrná její velikosti. Malé plazmidy se navíc snadno izolují a v buňkách dosahují vysokého počtu kopií.

syntéza komplementárního řetězce cDNA DNA-polymerázou, která využívá jako primer vlásenkový ohyb prvního vlákna cDNA vytvořeného zpětnou transkriptázou. Ohyb se pak vyštěpí S1-nukleázou. Pro klonování se konce dvouřetězcové cDNA upraví buď připojením homopolymerních konců, nebo spojek. Upozorňujeme, že existují i další postupy přípravy cDNA, z nichž řada je založena na využití PCR.

DNA syntetizovaná uměle chemickou cestou se obvykle připravuje postupným spojováním kratších dvouřetězcových úseků, vytvořených ze vzájemně komplementárních oligonukleotidů. Její celková délka pak může dosáhnout několika stovek párů bází a obsahovat sekvenci kompletního genu. Koncové sekvence mohou mít povahu kohezních konců, nebo jsou k nim napojeny dodatečně spojky.

Příprava vektorové molekuly ke spojení s cizorodou DNA je založena na jejím štěpení v klonovacím místě (příp. polylinkeru) restrikční endonukleázou, která vytváří konce komplementární ke koncům cizorodé DNA. Po smíchání takto připravených molekul cizorodé a vektorové DNA se jejich přesahující konce vzájemně spojí (renaturují) a po přidání DNA-ligázy se mezi nimi vytvoří kovalentní vazba. Lze spojovat též molekuly, které jsou po štěpení

- Schopnost snadného a účinného přenosu do hostitelských buněk.
- Schopnost replikace v hostitelské bakteriální buňce.
- Schopnost stabilního udržení cizorodé DNA při replikaci a uchovávání klonů.
- Musí obsahovat geny, na základě jejichž fenotypového projevu lze buňky nesoucí plazmid snadno selektovat. Označují se jako **selekční markery** a nejčastěji jsou to geny, které buňkám propůjčují rezistenci k antibiotikům, např. k ampicilinu, tetracyklinu, chloramfenikolu nebo neomycinu.
- Musí nést vhodná **klonovací místa**, tj. jedinečná restrikční místa pro restrikční endonukleázy, do nichž se začleňuje cizorodá DNA. Novější vektory obsahují většinou seskupení většího počtu restrikčních míst na krátké uměle vytvořené a do vektoru začleněné nukleotidové sekvenci, označované jako **mnohočetné klonovací místo** nebo též **polylinker** (obr. 20). Do tohoto místa lze vložit cizorodou DNA připravenou štěpením různými restrikčními enzymy.



Obr. 20 Struktura klonovacího vektoru pUC18. V rámečku jsou uvedeny restrikční endonukleázy, jejichž cílová místa se nacházejí v polylinkeru. *ampR* = gen pro rezistenci k ampicilinu (selekční marker), *ori* = počátek replikace a *lacZ'* = část genu *lacZ* kódující proximální úsek β -galaktozidázy.

ZPŮSOBY PŘENOSU PLAZMIDOVÝCH VEKTORŮ DO HOSTITELSKÝCH BUNĚK. Velmi často používaným hostitelem plazmidových vektorů jsou buňky kmenů *E. coli*. Přenos lze provést několika způsoby. Nejčastější je **transformace**, při níž jsou bakteriální buňky nejprve uvedeny do stavu kompetence, ve kterém jsou schopny přijmout cizorodou DNA. Stav kompetence lze u buněk *E. coli* navodit působením chloridu vápenatého za nízké teploty (0 °C). Po přidání DNA a krátkém zahřátí na 42 °C přechází transformující DNA do buněk. Transformované buňky se selektují na agarových plotnách obsahujících příslušné antibiotikum. Jiným způsobem přenosu DNA do bakterií je **elektroporace**, při níž se buňky v roztoku obsahujícím rekombinantní DNA vystaví krátkému elektrickému impulzu o vysokém napětí, kterým jsou v buněčné stěně vytvořeny póry, jimiž exogenní DNA vstupuje do buněk. Výhodou této metody je, že ji lze aplikovat nejen u mnoha různých druhů bakterií, ale též při přenosu DNA do buněk eukaryotických buněk. Určitou nevýhodou je nutnost optimalizace elektroporačních parametrů (délka elektrického pulzu a napětí) a nízká

specifita přenosu. Elektroporací se do buněk mohou zároveň s transformující DNA přenést další molekuly, včetně RNA nebo proteinů, navíc je přenos obousměrný, tj. vytvořenými póry může difundovat buněčný materiál ven z buňky.

Další metody, které se používají pro přenos DNA do živočišných a rostlinných buněk jsou uvedeny v kapitole VII.

IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH KOLONIÍ OBSAHUJÍCÍCH REKOMBINANTNÍ PLAZMIDY. Po přenosu plazmidových molekul do hostitelských buněk je třeba identifikovat transformanty (tj. buňky obsahující rekombinantní plazmidy) a odlišit je od buněk, do nichž byl přenesen plazmid bez cizorodé DNA (nerekombinantní plazmid). Nejčastěji se používají následující metody:

Restrikční analýza plazmidové DNA. Rekombinantní DNA se podrobí restrikční analýze, pomocí níž se prokáže přítomnost inzertu v rekombinantní plazmidové molekule.

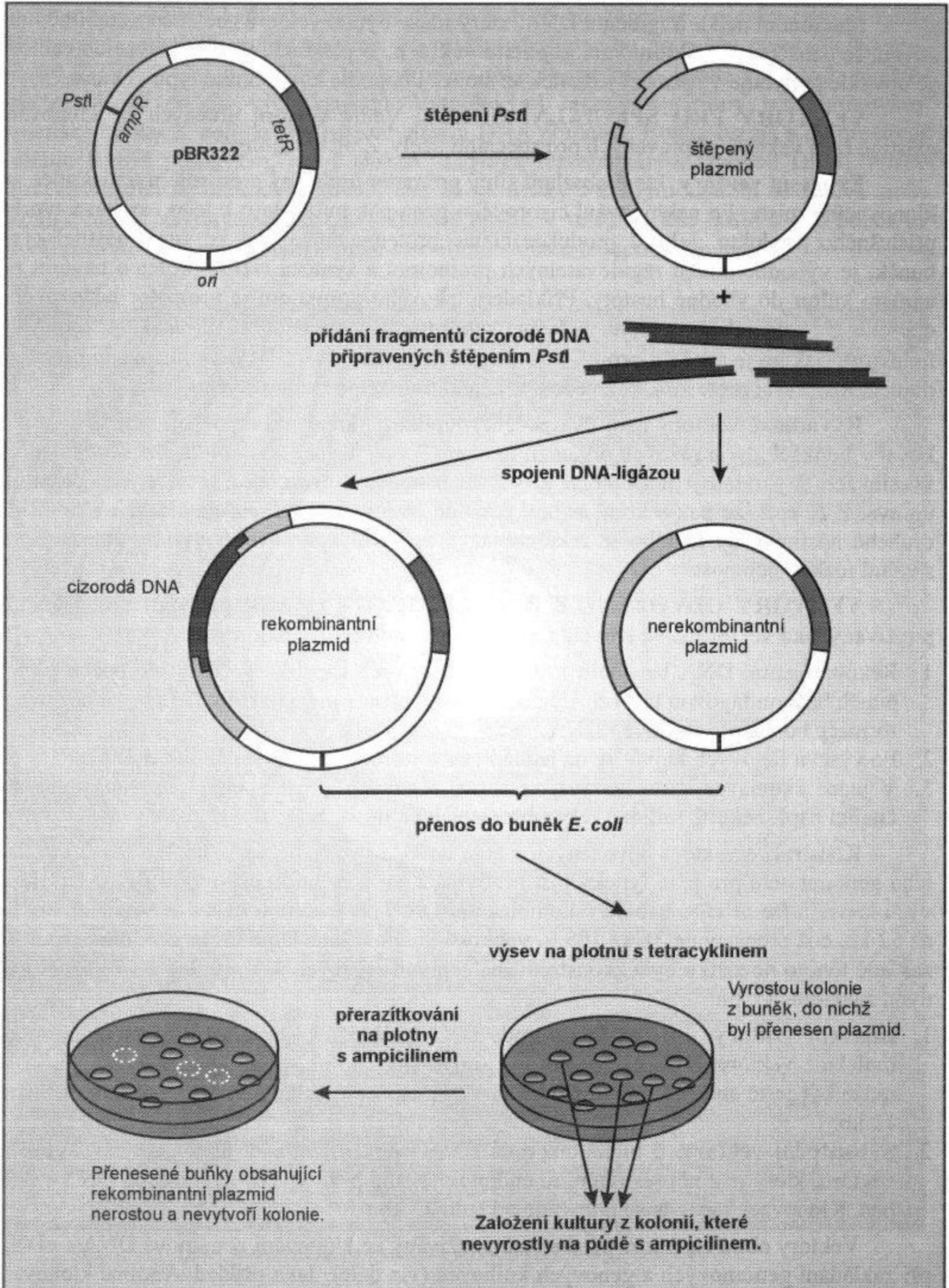
Inzerční inaktivace. Klonovací místo je ve vektoru umístěno v genu zodpovědném za rezistenci hostitelské buňky k určitému antibiotiku. Inzerce cizorodé DNA způsobí ztrátu funkce tohoto genu a proto se buňky nesoucí rekombinantní plazmid stanou k tomuto antibiotiku citlivé. To je odlišuje od buněk obsahujících vektor bez cizorodé DNA, které jsou k antibiotiku rezistentní.

Alfa-komplementace. Vektor nese krátký segment laktózového operonu *E. coli* obsahující regulační sekvence a část genu kódujícího β -galaktozidázu (*lacZ'*), jehož expresí vzniká N-koncový fragment tohoto enzymu (obr. 20). Do kódující sekvence je začleněno mnohočetné klonovací místo, které nepřerušuje čtecí rámeček. Vektory tohoto typu jsou používány v hostitelských buňkách *E. coli*, které kódují C-koncový fragment β -galaktozidázy. Ani jeden z polypeptidových fragmentů není sám o sobě aktivní, mohou se však spojovat za vzniku enzymově aktivního proteinu (tzv. alfa-komplementaci). Bakterie, do nichž je přenesen vektor bez inzertu, tvoří aktivní β -galaktozidázu, jejíž tvorbu lze prokázat na plotnách s chromogenním substrátem **5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktozidem (X-gal)**. Jeho rozkladem β -galaktozidázou vzniká produkt zbarvující bakteriální kolonie modře. Inzerce cizorodé DNA do klonovacího místa inaktivuje N-koncový fragment enzymu a ke komplementaci tak nedojde. Kolonie buněk s rekombinantním plazmidem jsou pak bílé. Indukce tvorby β -galaktozidázy je zajištěna **izopropyl- β -D-tiogalaktozidem (IPTG)**, který se přidává do živného media. Tento systém selekce je používán u mnoha plazmidových i fágových vektorů.

Po selekci transformantů je dalším krokem vyhledání klonu nesoucího studovanou sekvenci. To se provádí pomocí **hybridizace**. Buňky s rekombinantním plazmidem jsou vyhledány prostřednictvím sondy DNA, specifické pro sekvenci inzertu (kapitola II). Hybridizace se provádí na membráně, na kterou byly přeneseny kolonie buněk transformantů.

Klasickým plazmidovým vektorem používaným ke klonování v *E. coli* je plazmid pBR322. Nese geny určující rezistenci k ampicilinu a tetracyklinu, ve kterých jsou umístěna cílová místa pro několik restrikčních endonukleáz. Jako příklad klonování v pBR322 uvádíme začlenění cizorodé DNA do místa *Pst*I, které se nachází v genu pro rezistenci k ampicilinu (obr. 21). Plazmid a donorová DNA se štěpí restrikční endonukleázou *Pst*I, kohezní konce obou molekul se kovalentně spojí DNA-ligázou a rekombinantní vektorová molekula se přenesou do hostitelských buněk *E. coli* transformací. Selekcce se provádí na plotnách s tetracyklinem a ampicilinem. Nejdříve se buňky vysejí na plotny obsahující tetracyklin, kde vyrostou všechny transformované buňky. Vyrostlé kolonie se pak přenesou na plotny s ampicilinem, kde nevyrostou buňky, obsahující rekombinantní plazmid. Přenos se provádí pomocí bakteriologického razítka nebo sterilním párátkem.

KLONOVÁNÍ DNA



Obr. 21 Klonování DNA v plazmidovém vektoru pBR322

Maximální délka fragmentu DNA, který může být do vektorů začleněn a stabilně udržován, se označuje jako **klonovací kapacita vektoru**. U plazmidových klonovacích vektorů se obvykle pohybuje v rozmezí jednotek až stovek kb, podle konkrétního typu vektoru.

VEKTORY PRO SPECIÁLNÍ ÚČELY. Vedle vektorů určených ke klonování existuje řada vektorů připravených pro speciální účely. Z nich uvádíme:

Expresní vektory, které obsahují silný promotor umístěný proti směru transkripce od klonovacího místa. Po naklonování cizorodého genu pak může dojít k jeho expresi a tvorbě příslušného produktu. Jelikož produkce cizího proteinu může vést ke smrti hostitelských buněk, je výhodné použít regulovatelných promotorů a syntézu cizího proteinu navodit po nárůstu kultur do vhodné hustoty. Příkladem takového promotoru je promotor laktózoového operonu *E. coli*, jehož exprese je řízena represorem a operátorem. Přídavkem vhodného induktoru (jakým je např. isopropyl- β -D-tiogalaktopyranozid – IPTG) do růstového prostředí dojde k inaktivaci represoru, což vede k zahájení transkripce klonovaného genu.

Kyvadlové vektory mají dva počátky replikace, které jim umožňují účinně se replikovat v buňkách dvou různých organizmů, např. *E. coli* a *Bacillus subtilis*, anebo v *E. coli* a kvasinkách. Výhodou jejich použití je snadné klonování genu do *E. coli* a jeho případná úprava. Z *E. coli* lze pak rekombinantní plazmid izolovat ve velkém množství a přenést do druhého hostitele, do kterého se rekombinantní molekuly připravené *in vitro* přenášejí jen s velmi nízkou účinností.

VEKTORY ODVOZENÉ Z BAKTERIOFÁGA LAMBDA. Bakteriofág lambda používaný jako vektor má ve srovnání s plazmidovými vektory řadu výhod:

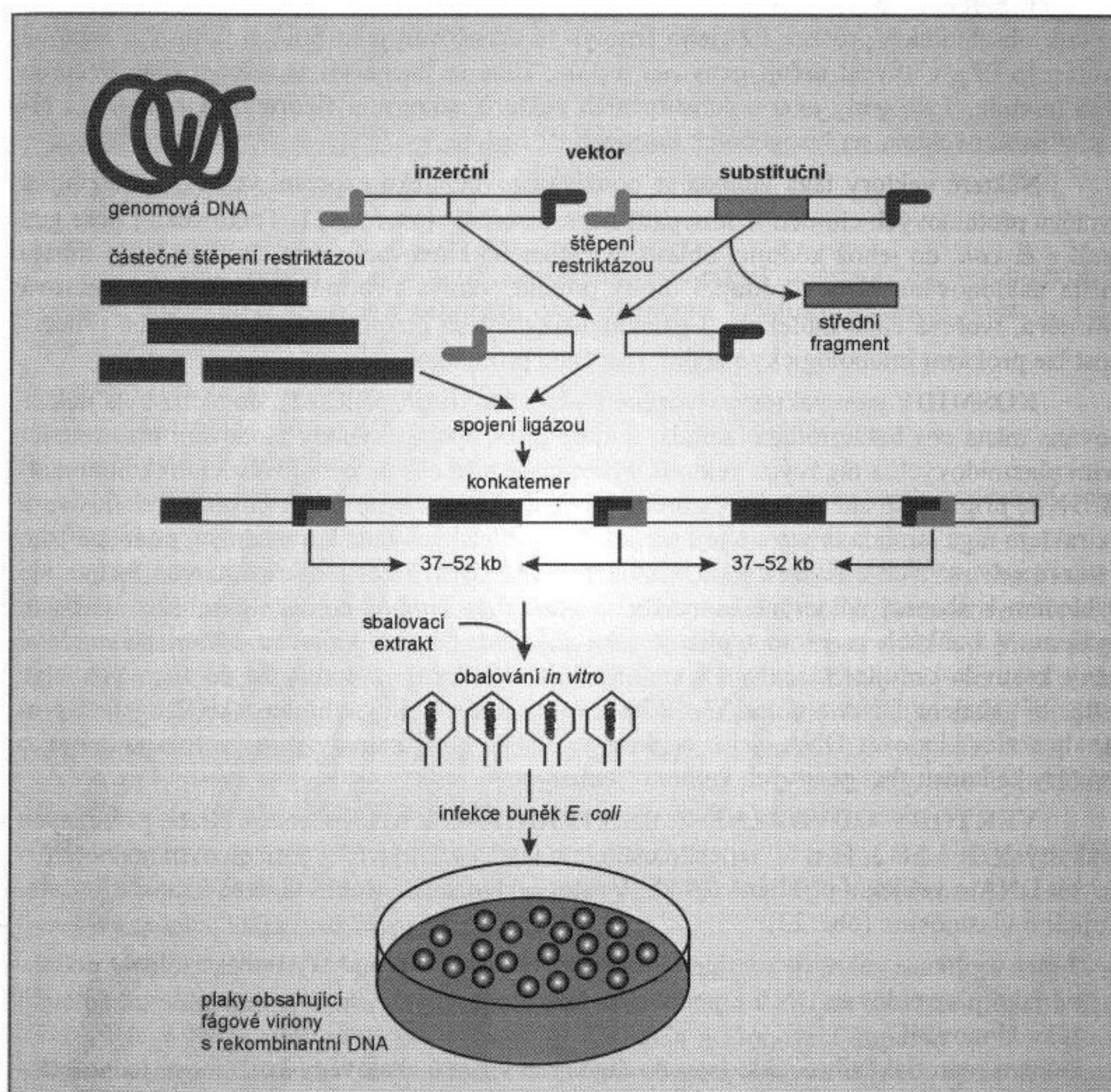
1. Rekombinantní DNA lze sbalit *in vitro* do fágových kapsidů a přenést do hostitelských buněk běžnou fágovou infekcí. Účinnost tohoto přenosu je o několik řádů vyšší než transformace buněk plazmidovou DNA.
2. Po výsevu fágových klonů lze na jedné Petriho misce analyzovat několik tisíc plak.
3. V jedné zkumavce lze uchovávat ve formě fágových virionů celou genovou knihovnu, čítající např. několik milionů rekombinantních klonů.

Konstrukce vektorů odvozených z fága lambda vychází z poznatku, že střední třetina jeho genomu není pro jeho lytický růst nezbytná a lze ji nahradit cizorodou DNA. Do fágových kapsidů lze *in vitro* zabalit rekombinantní DNA ohraničenou místy *cos* vzdálenými 37 až 52 kb, což představuje 78 až 105 % velikosti genomu fága lambda standardního typu. Na základě tohoto poznatku byla zkonstruována celá řada různých vektorů, které lze rozdělit do dvou základních typů:

1. **Inzerční vektory**, u nichž se cizorodá DNA vkládá do jednoho restrikčního místa na molekule vektoru. Velikost vlastní vektorové DNA je na spodní hranici velikosti, která může být ještě sbalena. Maximální klonovací kapacita těchto vektorů dosahuje přibližně 13 kb.
2. **Substituční vektory**, u nichž cizorodá DNA nahrazuje střední úsek genomu fágového vektoru, který je z něj restrikčními endonukleázami před vložením cizorodé DNA vyštěpen. Klonovací kapacita se pohybuje od 9 do 23 kb.

Vektory obou typů jsou přednostně používány ke klonování genomové DNA a cDNA při zakládání genomových a genových knihoven (viz dále). Jako příklad uvádíme klonování genomové DNA (obr. 22). Ta se nejdříve částečně štěpí vhodnou restrikční endonukleázou za vzniku restrikčních fragmentů různé délky. Vhodné průměrné délky restrikčních fragmentů se zpravidla dosahuje částečným štěpením. Použije-li se inzerční vektor, štěpí se v jednom místě. U substitučního vektoru se vyštěpí a odstraní střední fragment genomu. V obou případech je štěpený vektor tvořen dvěma rameny, mezi které se vloží fragment cizorodé DNA a

kovalentně spojí DNA-ligázou. Současně přitom se tvoří konkatemer spojením rekombinantních molekul prostřednictvím míst *cos*. Po přidání **sbalovacího extraktu** obsahujícího prekurzory fágových hlav a bičků je konkatemerní rekombinantní molekula v místech *cos* štěpena a sbalena do fágových kapsidů. Vytvořenými fágovými viriony jsou infikovány hostitelské buňky *E. coli*, kde se rekombinantní DNA pomnoží. Buňka lyzuje a do prostředí uvolňuje fágové potomstvo, jehož genom je tvořen rekombinantní fágovou DNA. Výsev fágových virionů se prakticky provádí tak, že na misky s živným agarem se nalévá směs virionů a hostitelských buněk *E. coli* v řídkém agaru. V místech, kde došlo k lyzi buněk se vytvoří průsvitná skvrnka (plak) v jinak souvislém nárůstu bakteriálních buněk.



Obr. 22 Klonování DNA prostřednictvím vektorů odvozených z fága lambda

SELEKCE FÁGOVÝCH KLONŮ S REKOMBINANTNÍ DNA. Přirozená selekce rekombinantních molekul je dána spodní a horní hranicí velikostí DNA, která může být účinně sbalena do fágových kapsidů. Ke zvýšení účinnosti selekce se u jednotlivých typů vektorů dále používá:

1. Inaktivace genu *cI*. Inzerční inaktivací genu *cI* po vložení cizorodé DNA (u inzerčních vektorů) nebo jeho odstraněním jako součásti středního fragmentu (u substitučních vektorů) budou rekombinantní viriony tvořit plaky na *E. coli* K12 (λ^-), které jsou nerekombinantními viriony lyzogenizovány. Gen *cI* kóduje fágový represor – pokud je tento gen inaktivován nebo odstraněn, není fág schopen lyzogenizace.

2. Selektce založená na α -komplementaci. Klonovací místo, stejně jako u plazmidových vektorů, je začleněno do části genu pro β -galaktozidázu. Nerekombinantní viriony tvoří na plotnách s X-gal a IPTG modré plaky. Plaky tvořené rekombinantními viriony jsou bezbarvé.

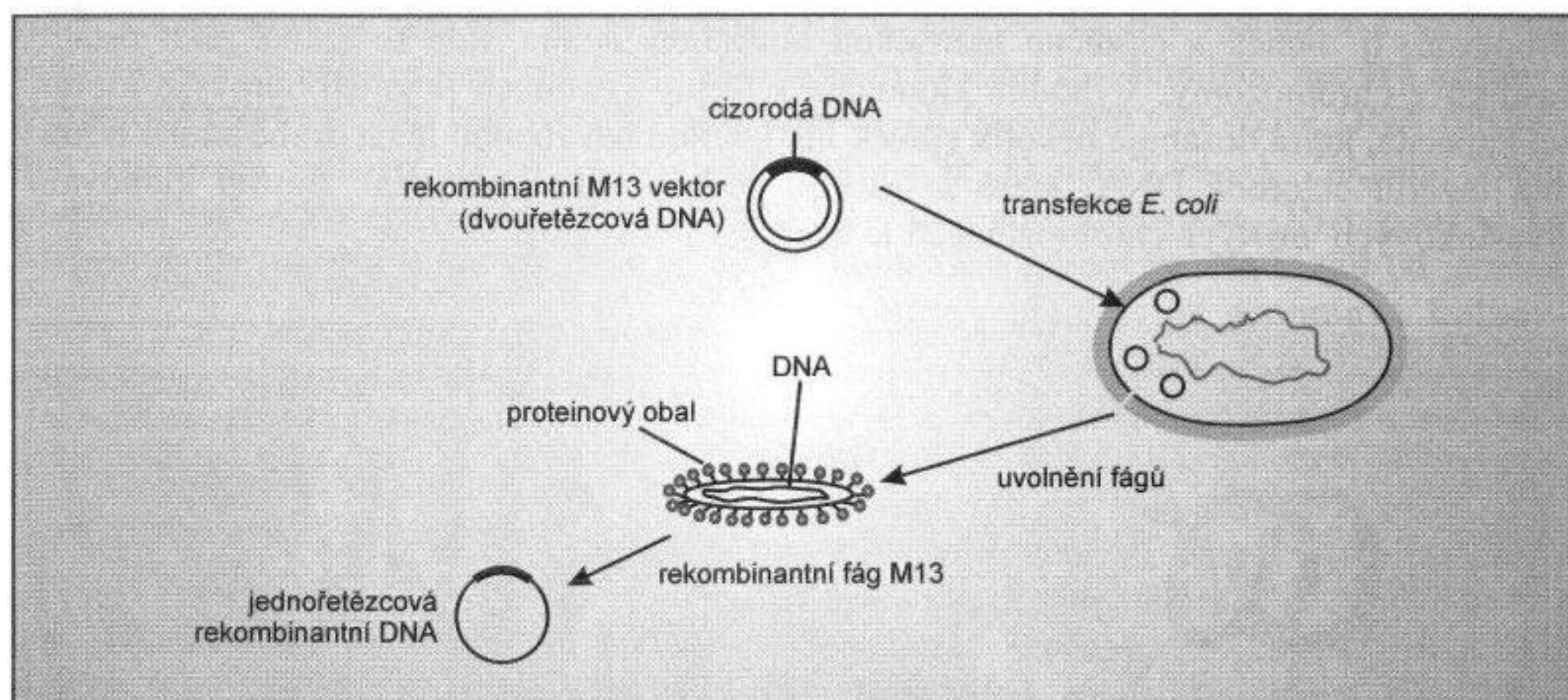
3. Selektce podle fenotypu Spi^- . Fág lambda standardního typu neroste na kmenech *E. coli* obsahujících profága P2 (jeho fenotyp je označován jako Spi^+ , tj. citlivý k inhibici profágem P2). Citlivost určují geny *red* a *gam*, které se nacházejí ve střední části genomu fága lambda. Tyto geny jsou u substitučních vektorů nahrazeny cizorodou DNA, takže rekombinantní vektory na lyzogenních kmenech P2 rostou.

Některé vektory fága lambda se používají rovněž jako expresní vektory, umožňující syntézu proteinových chimér. K nim patří např. inzerční vektor $\lambda\text{gt}11$. Tento vektor nese gen *lacZ* z *E. coli*, do jehož kódující oblasti je začleněno klonovací místo. Jestliže je do tohoto místa naklonována cDNA kódující určitý protein, vzniká hybridní produkt – **proteinová chiméra**, tvořená částí molekuly β -galaktozidázy a částí cizorodého proteinu. Jeho přítomnost lze prokázat imunologicky vhodně značenou protilátkou.

KOSMIDY jsou vektory odvozené z plazmidů (např. pBR322), do nichž byla naklonována místa *cos* bakteriofága lambda, a které proto spojují výhody klonování prostřednictvím plazmidových a fágových vektorů. Přítomnost míst *cos* umožňuje sbalení rekombinantní DNA, připravené začleněním cizorodé DNA do klonovacího místa kosmidu, sbalovacím extraktem fága lambda *in vitro* a její přenos do hostitelských buněk transdukcí, podobně jako vektorů odvozených z fága lambda. Uvnitř bakterií získává kosmid kružnicovou formu, ale vzhledem k absenci některých esenciálních genů fága lambda nemůže procházet lytickým cyklem. V buňkách se proto replikuje jako plazmid. Selektci klonů umožňují plazmidové geny kosmidu určující rezistenci k antibiotikům. Vzhledem k tomu, že do fágových hlav může být sbalena DNA o délce 37–52 kb a velikost kosmidů je zhruba 5 kb, lze jejich prostřednictvím klonovat DNA, jejíž velikost je 32–47 kb. Kosmidy jsou proto vhodné jako vektory ke konstrukci genových knihoven eukaryot.

VEKTORY ODVOZENÉ Z BAKTERIOFÁGA M13. Genom blízce příbuzných vláknitých fágů M13, f1 a fd, jejichž hostitelem je *E. coli*, je tvořen kružnicovou jednořetězcovou DNA o velikosti přibližně 6,4 kb. Vektory odvozené z těchto fágů se vyznačují následujícími vlastnostmi (obr. 23):

1. Jejich replikace zahrnuje tvorbu dvouřetězcové DNA, kterou lze z buněk izolovat podobně jako plazmidovou DNA a podobným způsobem s ní lze *in vitro* manipulovat a použít ji ke klonování.
2. Během reprodukčního cyklu jsou do fágových virionů sbalovány kružnicové jednořetězcové molekuly DNA, které lze velmi snadno izolovat.
3. Do fágových virionů mohou být sbaleny molekuly DNA, jejichž velikost dosahuje několiknásobku délky fágového genomu.



Obr. 23 Klonování ve vektorech M13

Tyto vlastnosti umožnily konstrukci vektorů pro přípravu jednořetězcových rekombinantních molekul DNA, které nahradily dřívější pracné techniky separace řetězců. Takto připravené jednořetězce jsou používány:

- k sekvencování enzymovou metodou,
- k mutagenizi *in vitro* prostřednictvím mutagenních oligonukleotidů,
- k přípravě hybridizačních sond transkripce *in vitro*,
- k replikaci a replikativní rekonstrukci chromatinu *in vitro* v extraktech vajíček *Xenopus laevis*.

PLAZMIDOVÉ VEKTORY NESOUCÍ BAKTERIOFÁGOVÉ PROMOTORY.

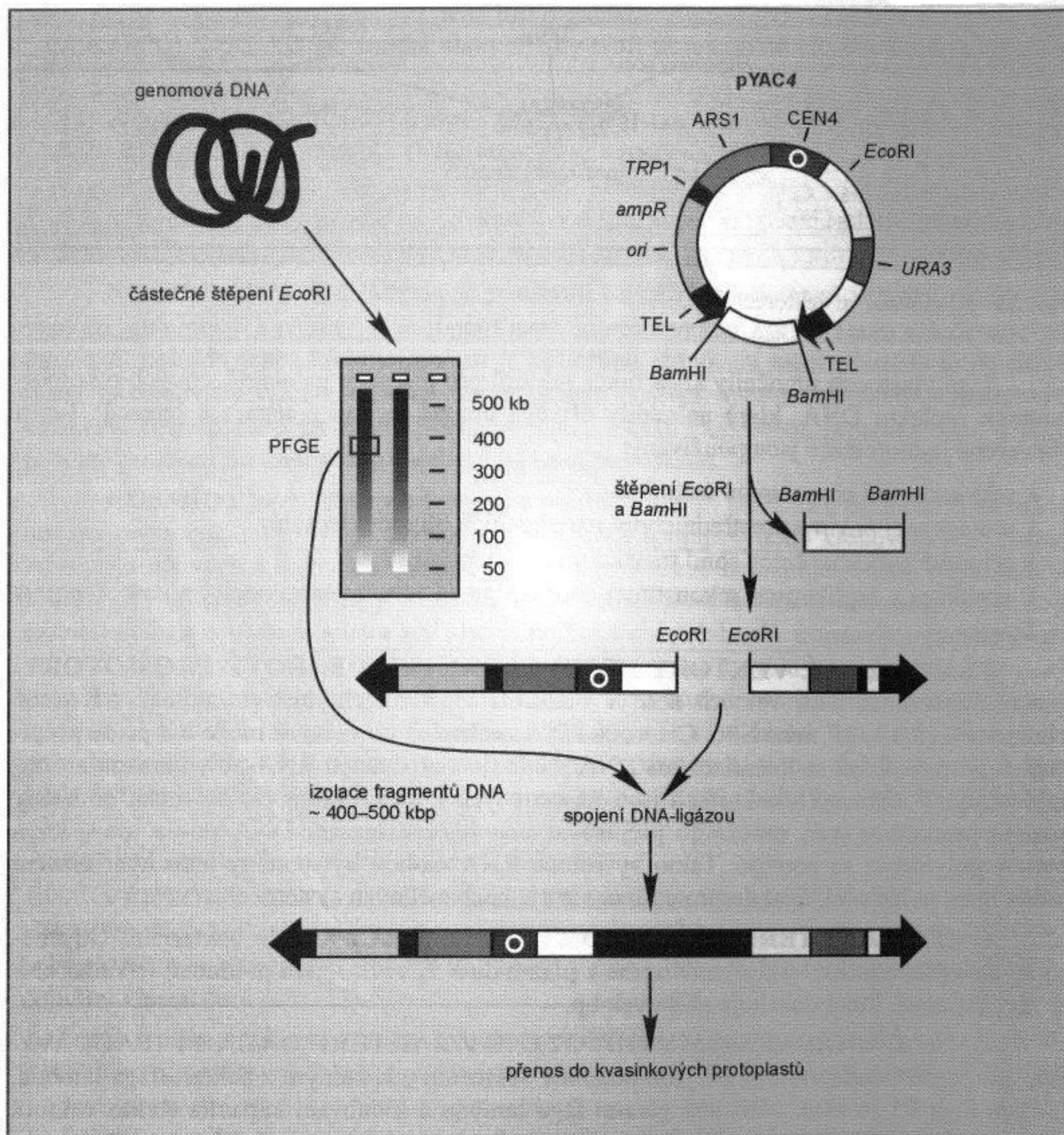
Značná část moderních vektorů nese v blízkosti klonovacích míst promotory odvozené z bakteriofágů T3, T7 nebo SP6. Cizorodá DNA začleněná do vektoru může být proto přepisována *in vitro*, když se linearizovaná DNA inkubuje s příslušnou RNA-polymerázou a ribonukleotidy. V některých vektorech jsou na opačných koncích klonovacího místa umístěny odlišné promotory, což umožňuje přepisovat oba řetězce inzertu DNA podle toho, která z RNA polymeráz se použije. Takto vytvořené RNA mohou být použity jako hybridizační sondy nebo je lze překládat do proteinů *in vitro* v bezbuněčných systémech.

UMĚLÉ BAKTERIÁLNÍ CHROMOZOMY (BAC). Umělé bakteriální chromozomy jsou plazmidové vektory odvozené z plazmidu F *E. coli*. Jejich předností je velká klonovací kapacita, která dosahuje až stovek bp.

UMĚLÉ CHROMOZOMY ODVOZENÉ Z BAKTERIOFÁGA P1 (PAC). Vektory odvozené z bakteriofága P1 jsou podobné vektorům odvozeným z bakteriofága lambda. Genom fága P1 je však větší než genom fága lambda a klonovací kapacita těchto vektorů proto dosahuje až 125 kb. Umělé chromozomy odvozené z bakteriofága P1, u nichž se kombinují vlastnosti vektorů P1 a BAC, mají klonovací kapacitu až 300 kb.

UMĚLÉ KVASINKOVÉ CHROMOZOMY (YACs). Umělé kvasinkové chromozomy patří mezi kyvadlové plazmidové klonovací vektory, replikující se v buňkách *E. coli* a v kvasinkách. Vedle sekvencí bakteriálního plazmidu obsahují části kvasinkového chromozomu (centromeru, sekvence pro autonomní replikaci, dvě kvasinkové telomery a selektovatelné signální znaky). Po štěpení plazmidu se vytvoří dvě ramena, mezi něž se vloží klonovaná genomová DNA. Rekombinantní DNA je vnesena transformací do kvasinkových

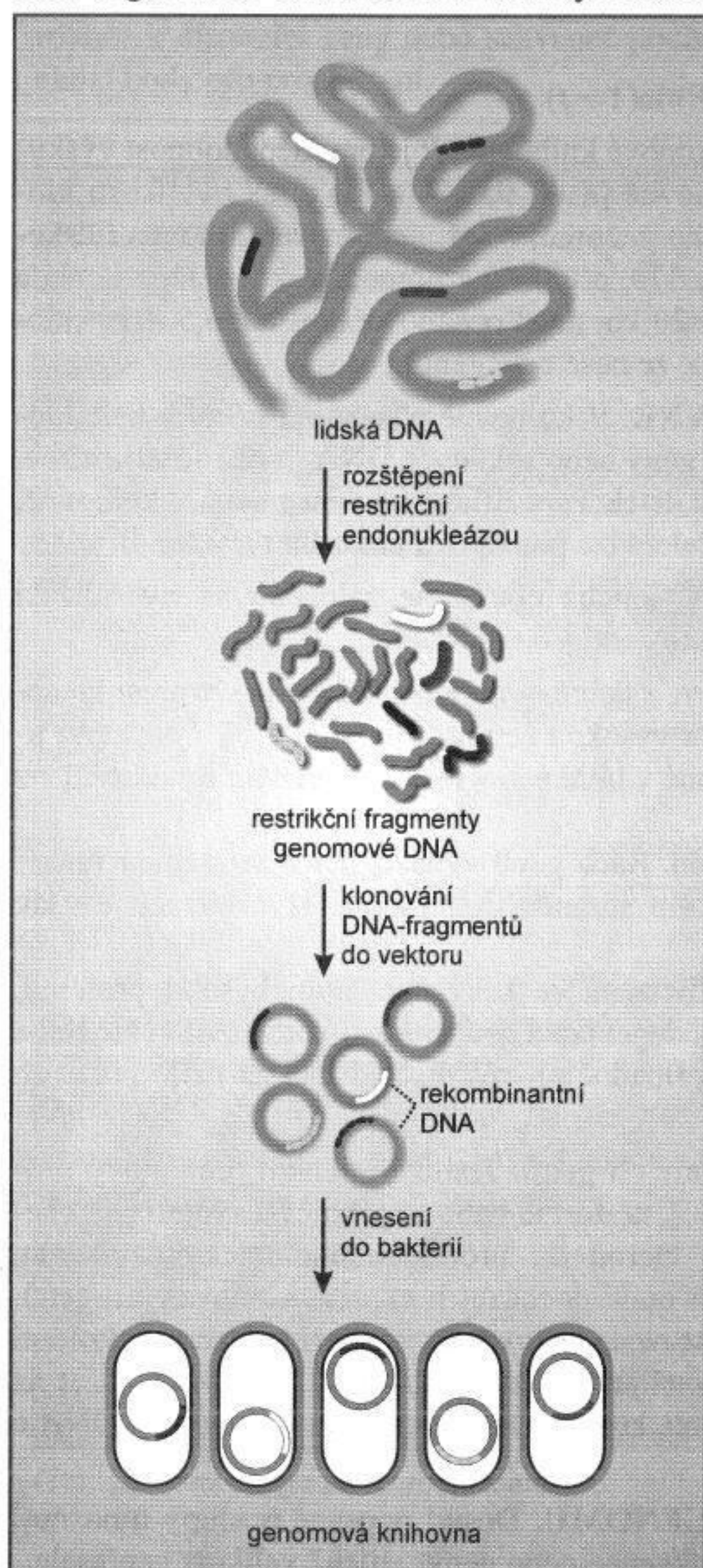
sféroplastů, tj. buněk s částečně narušenou buněčnou stěnou, kde se chová jako ostatní kvasinkové chromozomy. Výhodou klonování v těchto vektorech je jejich obrovská klonovací kapacita, která dosahuje několik stovek kb. Určitou nevýhodou je na druhé straně nestabilita inzertů cizorodé DNA, které se mohou podrobovat přestavbám. Postup klonování v kvasinkových umělých chromozomech je uveden na obr. 24.



Obr. 24 Klonování genů v kvasinkových umělých chromozomech

Vysvětlivky: ARS1 – počátek replikace aktivní v kvasinkové buňce, TEL – telomerová sekvence z *Tetrahymena*, CEN4 – centromera, TRP1 a *URA3* – markery pro selekci vektoru v kvasinkových buňkách, *ampR* – bakteriální selekční marker, *ori* – počátek replikace aktivní v bakteriální buňce.

ZAKLÁDÁNÍ GENOVÝCH KNIHOVEN. Jestliže má být vyhledán a klonován konkrétní gen určitého organismu, je obvykle prvním krokem založení jeho **genové knihovny (genové banky)**. Je to soubor náhodně klonovaných fragmentů genomové DNA příslušného organismu. Celkově lze knihovny klasifikovat podle několika hledisek. Základní dělení



Obr. 25 Konstrukce genomové knihovny z lidského genomu

cizorodé DNA a jsou proto používány jen pro menší genomy, např. virové. Pro konstrukci genomových knihoven eukaryotických organismů se nejčastěji používají vektory odvozené z fága lambda a kosmidy, případně umělé kvasinkové, bakteriální a jiné umělé chromozomy s velkou klonovací kapacitou, jejichž použití podstatně sníží velikost knihoven. V závislosti na použitém vektoru je pak plazmidová nebo kosmidová knihovna souborem definovaných

je založeno na původu DNA použité ke konstrukci knihovny. Na rozdíl od genové knihovny představuje **genomová knihovna (genomová banka)** soubor klonovaných fragmentů připravených štěpením genomové DNA, které dohromady reprezentují celý genom daného organismu (obr. 25). **Knihovna cDNA** je tvořena klony, které obsahují molekuly cDNA, připravené zpětnou transkripcí mRNA izolované z buněk organismu. Protože buňky každé z tkání organismu tvoří odlišný soubor molekul mRNA, budou se knihovny cDNA připravené z různých typů tkání navzájem lišit.

Každý z uvedených typů knihoven má své výhody a nevýhody. Výhodou cDNA knihovny je její menší velikost, protože neobsahuje sekvence intronů, regulační oblasti a nepřepisované sekvence. Její prohledávání bude proto celkově snadnější a rychlejší. Genomová knihovna je podstatně větší, zato však umožňuje studovat geny v jejich přirozené podobě, včetně intronů a regulačních oblastí. Její konstrukce je nutná rovněž pro fyzikální analýzu genomu, jejímž předpokladem je sestavení souvislé úplné sekvence dlouhých úseků chromozomů.

Dalším typem knihovny je **expresní genová knihovna**. Rozumí se jí knihovna cDNA vytvořená expresními vektory, které umožňují klonované sekvence exprimovat. Podle jiného kritéria se knihovny klasifikují na základě typu vektoru použitého k jejich konstrukci. Různé klonovací vektory mohou nést fragmenty DNA různé velikosti. Výběr vektoru závisí na velikosti genomu, z něhož se knihovna připravuje. Plazmidy mohou nést jen krátké fragmenty

kultur bakterií nesoucích plazmidy nebo kosmidy, fágová knihovna souborem fágových částic a knihovna umělých kvasinkových chromozomů souborem kvasinkových kmenů.

Důležitou charakteristikou každé genomové knihovny je její velikost, která udává minimální počet klonů postačující pro zachycení celého genomu. Velikost knihovny určitého organismu lze vypočítat podle vzorce

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f),$$

kde N je počet nezávislých klonů v genomové knihovně, P je pravděpodobnost výskytu dané genomové sekvence v genomové knihovně (např. 95 %), a f je poměr velikosti klonovaných fragmentů (inzertů) k velikosti celého genomu. Např. genomová knihovna lidského genomu, který má velikost přibližně 3 000 Mb, připravená pomocí vektoru fága lambda s průměrnou velikostí klonovaných fragmentů 20 kb, musí obsahovat alespoň $6,5 \times 10^5$ klonů, aby bylo s 99% pravděpodobností zaručeno, že nese celý genom.

VYHLEDÁVÁNÍ GENŮ V KNIHOVNĚ. V knihovně obsahující několik tisíc klonovaných fragmentů je třeba klony obsahující geny nebo sekvence DNA, o něž se zajímáme, nejdříve vyhledat. Metoda, kterou použijeme k detekci specifické sekvence genů v knihovně, se označuje jako **vyhledávání genů**. Za tím účelem lze použít dva základní typy sond:

Sondy pro vyhledání sekvencí DNA, jejichž použití je založeno na hybridizaci nukleových kyselin. Zdrojem pro přípravu těchto sond jsou nejčastěji:

1. cDNA, obvykle připravené prepisem mRNA z tkáně, v níž dochází k silné expresi hledaného genu a mRNA se v buňkách nachází s vysokou četností. Existují však i postupy, jimiž lze izolovat i molekuly mRNA přítomné v buňkách v relativně malém množství (viz kap. VIII).
2. Sekvence DNA genu příbuzného organismu. Řada genů vyznačujících se stejnou funkcí obsahuje konzervativní sekvence s vysokým stupněm homologie. Hybridizaci je však třeba provést za málo přísných podmínek.
3. Synteticky připravené oligonukleotidy odvozené ze sekvence aminokyselin proteinu, kódovaného hledaným genem. Vzhledem k degeneraci genetického kódu je obvykle třeba připravit několik alternativních sekvencí, případně provést hybridizaci za málo přísných podmínek.

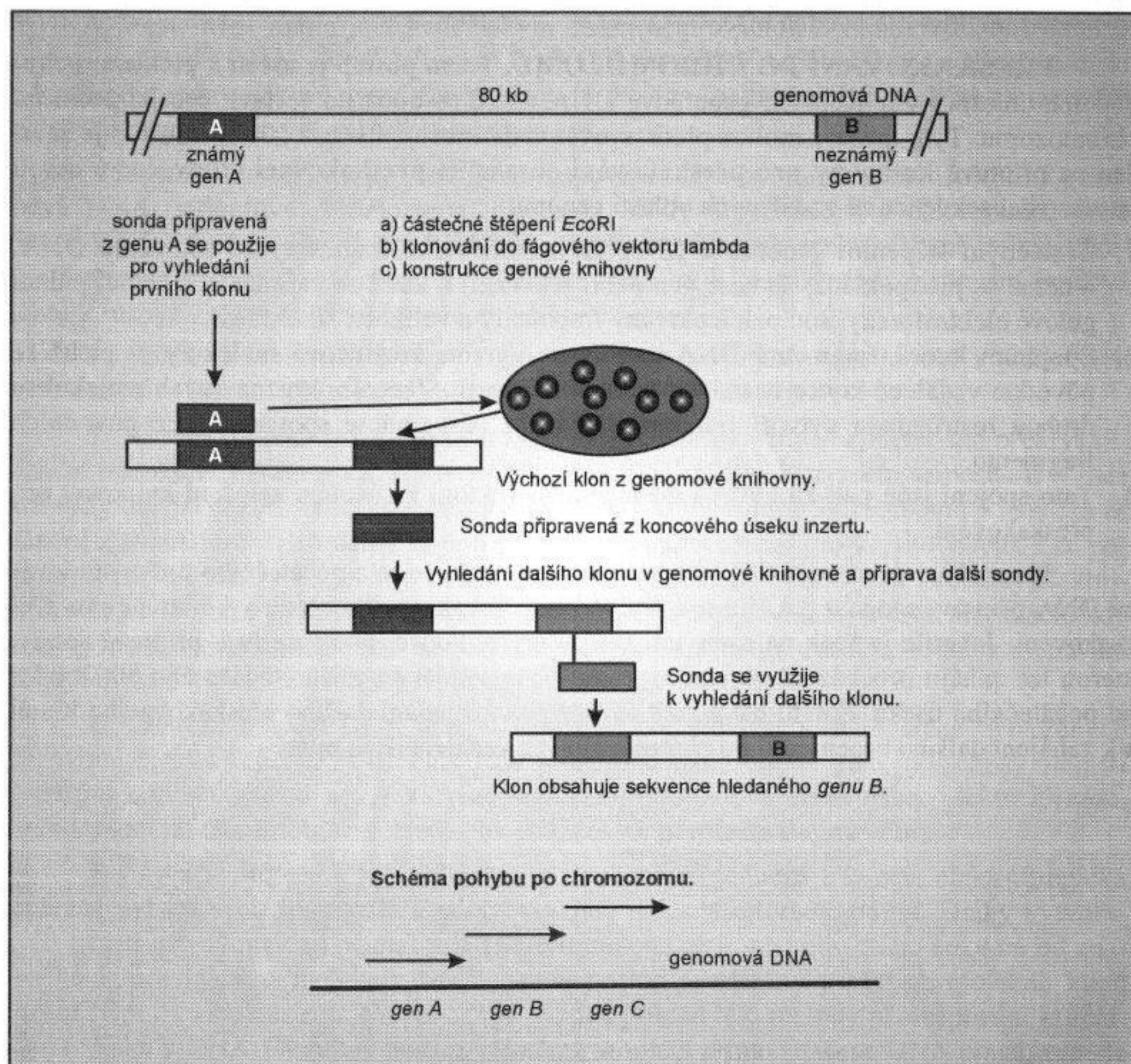
Sondy pro vyhledání produktů hledaných genů. Jestliže je znám proteinový produkt hledaného genu a podaří se jej izolovat v čisté formě nebo se jeho část syntetizuje chemicky, lze jej použít k přípravě protilátky, kterou lze protein imunologicky detekovat. Nejdříve se připraví expresní knihovna, v níž bude docházet k expresi klonovaných genů. Identifikace klonu nesoucího hledaný gen se provede analogicky jako při hybridizaci kolonií nebo plak s tím rozdílem, že se jako sonda použije značená protilátka. Ta se bude vázat na membránu v místě odpovídajícímu poloze klonu, který obsahuje klonovaný fragment DNA a exprimuje jej.

ANALÝZA DLOUHÝCH ÚSEKŮ GENOMU. Dosud popsané postupy umožňují v genových knihovnách vyhledat specifické sekvence nebo geny, jejichž velikost nepřesahuje klonovací kapacitu použitých vektorů. Jednotlivé inzerty DNA klonované do fágových nebo kosmidových vektorů, které se ke konstrukci knihoven používají nejčastěji, představují poměrně krátké úseky genomu. Řada situací vyžaduje, aby byl charakterizován dlouhý nepřetržitý úsek genomu představující stovky kilobází. K tomu lze použít dva vzájemně se doplňující postupy, které se označují jako procházení po chromozomu a přeskokování po chromozomu.

PROCHÁZENÍ PO CHROMOZOMU (obr. 26). Cílem tohoto postupu je vyhledat v genomové knihovně klony, jejichž inzerty cizorodé DNA se překrývají a navzájem na sebe

KLONOVÁNÍ DNA

navazují. Uspořádáním těchto klonů lze pak získat informaci o spojitě sekvenci určité oblasti genomu. Velmi často se tento postup uplatňuje při izolaci genů nebo sekvencí s neznámou funkcí, pro něž dosud není vhodná sonda k dispozici. Z předchozí, např. genetické analýzy, je však přibližně známa oblast genomu, v níž se hledaný gen nebo sekvence nachází, a jsou rovněž k dispozici geny nebo sekvence pocházející z okolních oblastí, které slouží jako výchozí body pro procházení.



Obr. 26 Procházení pro chromozomu

Nejprve se použije sonda pro vyhledání klonu nesoucího část již dříve charakterizovaného úseku genomu. Jakmile je klon vyhledán, jsou z koncových částí insertu klonované DNA připraveny sondy, kterými je genomová knihovna znovu prohledána. Je vyhledán druhý klon, jehož insert se částí své sekvence překrývá s insertem prvního klonu. Z koncového úseku insertu druhého klonu je pak opět připravena sonda, která se použije k vyhledání třetího klonu. Opakováním tohoto postupu nakonec získáme ve formě překrývajících se insertů, tj. klonovaných fragmentů DNA, souvislou sekvenci, která má začátek v charakterizovaném úseku genomu a končí v cílové oblasti vzdálené stovky kilobází, která pak může být podrobně prostudována. Délka jednotlivých kroků závisí na průměrné velikosti fragmentu DNA

klonovaného do vektoru použitého pro konstrukci genomové knihovny. Procházet po chromozomu lze oběma směry.

Během procházení po chromozomu může dojít k situaci, kdy není možné jednoznačně vyhledat další překrývající se klonovaný fragment DNA. Určité úseky genomu se totiž v kosmidových a fágových vektorech klonují obtížně nebo je nelze vůbec klonovat, případně jsou tvořeny repeticemi, které nelze jako sondy pro vyhledání dalších klonů využít. Pokud tato situace nastane, lze další klonované fragmenty vyhledat postupem přeskokování po chromozomu, který je uveden níže.

PŘESKAKOVÁNÍ PO CHROMOZOMU. Tento postup je určen k překlenutí chybějících „mezer“ v sekvencích genomové DNA, které se podařilo sestavit procházením po chromozomu. Tyto mezery mohou představovat vzdálenosti větší než 100 kb. Postup je založen na přípravě **knihovny pro přeskokování** obsahující **přeskakovací klony**, které nesou nesousedící sekvence ze vzdálených oblastí genomu:

1. Částečným štěpením genomové DNA se vytvoří velké fragmenty ze segmentu DNA, o němž se předpokládá, že nese gen nebo sekvenci, o které se zajímáme. Pomocí pulzní gelové elektroforézy jsou pak izolovány fragmenty o velikosti 50–200 kb.
2. Spojením konců fragmentů DNA-ligázou se vytvoří kružnicové molekuly, v nichž se původně vzdálené konce nacházejí v těsné blízkosti. Štěpením kružnicových molekul se druhou restriktázou vytvoří fragmenty, z nichž část ponese spojené konce původních fragmentů.
3. Tato spojení jsou pak klonována do fágového vektoru za účelem založení knihovny pro přeskokování.

Při analýze genomové DNA se pak postupuje tak, že se z počátečního úseku studované DNA připraví sonda a použije se k vyhledání přeskakovacího klonu v knihovně pro přeskokování. Jakmile je klon nalezen, použije se druhý konec jeho inzertu k přípravě sondy, kterou lze zahájit procházení po chromozomu oběma směry z místa vzdáleného 50–200 kb od počátečního úseku. Sondu lze použít rovněž pro vyhledání dalšího přeskakovacího klonu a k zahájení dalšího procházení po chromozomu ze vzdálenějších míst.

IV. Fyzikální mapování DNA (genomu)

1. Konstrukce restrikčních map

Konstrukce přesné restrikční mapy bývá jedním ze základních kroků při charakterizaci DNA. **Restrikční mapa** je schematickým znázorněním poloh a vzdáleností restrikčních míst na molekule DNA. Je tudíž formou **fyzikální mapy DNA**, jelikož se vzdálenosti mezi jednotlivými místy udávají v počtech nukleotidů. Postup, podle kterého probíhá sestavování restrikční mapy, se nazývá **restrikční mapování**.

Výchozím materiálem pro restrikční mapování může být neporušená izolovaná genomová DNA (jednotlivé chromozomy, plazmidy, DNA mitochondrií a chloroplastů nebo genomová DNA virů), fragmenty DNA klonované ve vektorech anebo získané polymerázovou řetězovou reakcí. V závislosti na velikosti DNA se k restrikčnímu mapování používá několik různých postupů, které lze vzájemně kombinovat.

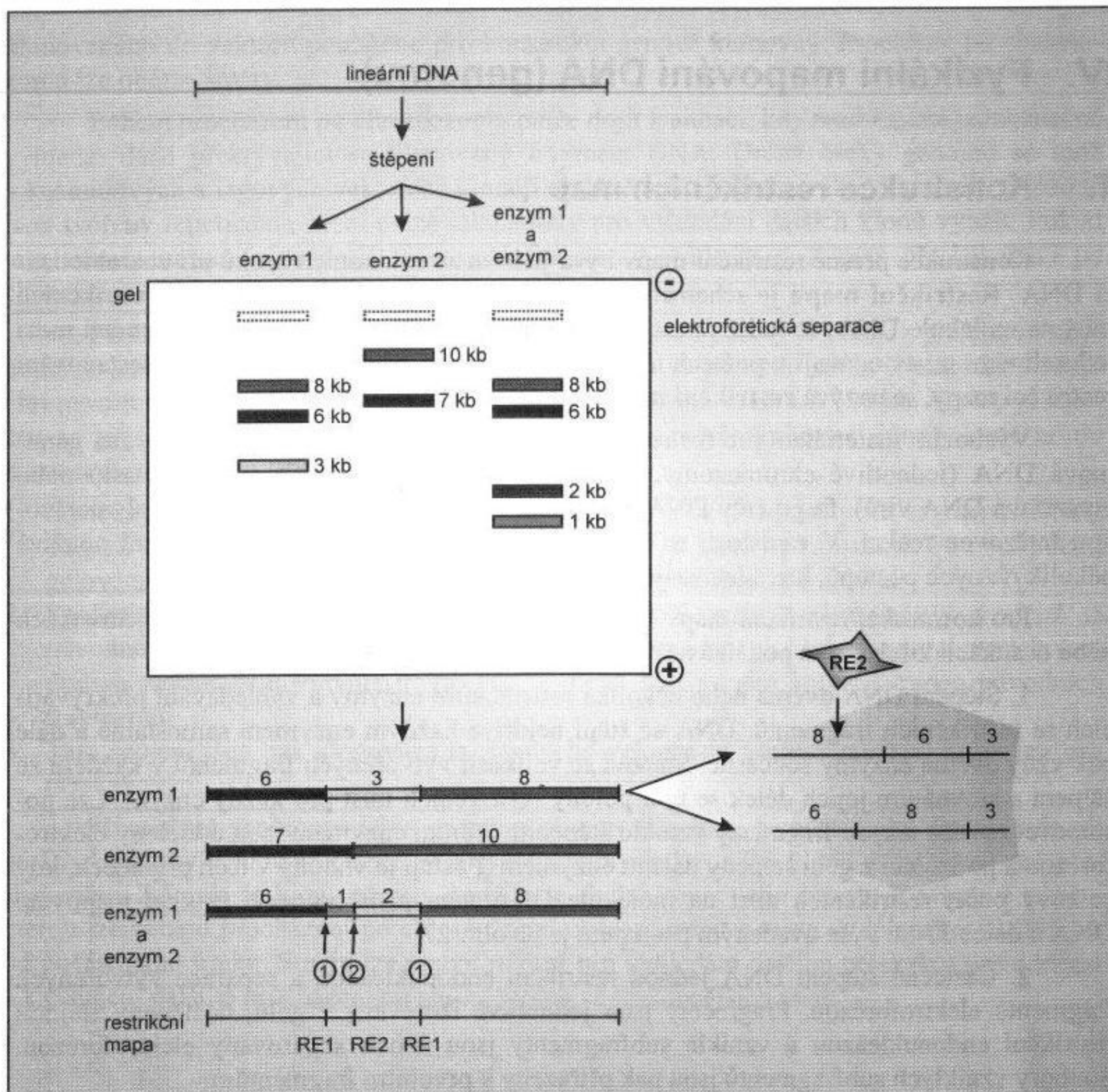
Pro konstrukci restrikční mapy DNA, jejíž velikost se pohybuje řádově v jednotkách nebo desítkách kilobází, se používá některá z následujících metod:

1. Štěpení DNA dvěma nebo několika restrikčními enzymy a vyhledávání překrývajících se restrikčních fragmentů. DNA se štěpí nejdříve každým enzymem samostatně a dále pak vždy dvěma enzymy současně. Stanoví se velikosti vytvořených fragmentů v každém ze štěpení a srovnáním jejich délek se určí polohy restrikčních míst pro každý enzym. Lze postupovat rovněž tak, že fragmenty vzniklé štěpením jedním enzymem jsou odděleny elektroforézou a po izolaci z gelu štěpeny dalším enzymem. Postup je vhodný v těch případech, kdy celkový počet restrikčních míst na molekule DNA není příliš vysoký. Příklad mapování DNA o délce 17 kb výše uvedeným postupem je na obr. 27.

2. Částečné štěpení DNA jednou restrikční endonukleázou a separace vytvořených fragmentů elektroforézou. Fragmenty jsou jednotlivě izolovány z gelu, doštěpeny stejnou restrikční endonukleázou a vzniklé subfragmenty jsou znovu separovány elektroforézou. Soubory vzniklých subfragmentů jsou pak přiřazeny k prvotním fragmentům.

3. Částečné štěpení DNA radioaktivně značené na jednom z konců, elektroforetická separace vytvořených fragmentů a odečtení jejich délek z autoradiogramu. Délky vytvořených fragmentů odpovídají přímo vzdálenostem restrikčních míst použitého enzymu od značeného konce výchozí molekuly DNA. Tento postup je vhodný u větších molekul, které enzym štěpí na více místech. Na obr. 28 je uveden příklad této metody při mapování kružnicové molekuly DNA. Obdobný postup, při němž se místo přímo značené DNA použije sonda komplementární ke koncové oblasti, se nazývá nepřímé značení konců. Pomocí takové sondy budou technikou Southernovy hybridizace detekovány pouze restrikční fragmenty obsahující koncovou oblast. Výhodou tohoto postupu je omezení práce s radioaktivitou.

Konstrukce přesné restrikční mapy je ve všech uvedených případech podmíněna identifikováním všech vytvořených restrikčních fragmentů a přesným stanovením jejich velikosti, která se určuje gelovou elektroforézou.



Obr. 27 Konstrukce restrikční mapy kombinovaným štěpením dvěma restrikčními enzymy. Štěpení molekuly DNA enzymem 1 vedlo k vytvoření 3 kb, 6 kb a 8 kb fragmentu (tj. na DNA jsou pro tento enzym dvě cílová místa), ale neprokázalo, zda se 3 kb fragment nachází uprostřed nebo na konci štěpené sekvence. Kombinované štěpení enzymy 1 a 2 ponechalo 6 kb a 8 kb fragmenty intaktní, ale došlo k rozštěpení 3 kb fragmentu, což dokazuje, že enzym 2 štěpí uvnitř 3 kb fragmentu vytvořeného enzymem 1. Pokud by 3 kb fragment byl na konci analyzované sekvence, pak štěpení samotným enzymem 2 musí dávat 1 kb nebo 2 kb fragment. Protože tomu tak není, musí být 3 kb fragment vytvořený po štěpení enzymem 1 uprostřed. To, že cílové místo pro enzym 2 leží blíže 6 kb fragmentu než 8 kb fragmentu lze odvodit z faktu, že po štěpení enzymem 2 vznikají fragmenty o velikostech 7 kb a 10 kb.

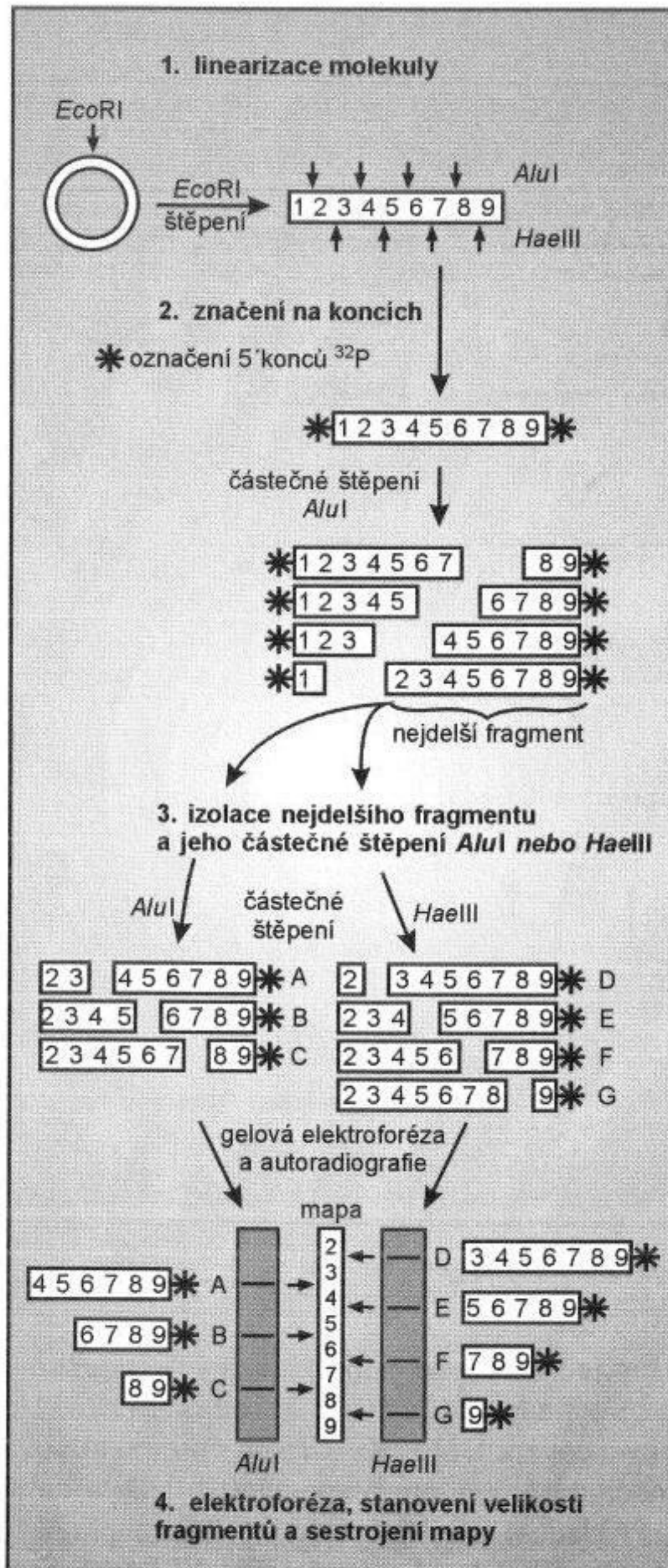
Restrikční mapy umožňují např. srovnávat DNA různých jedinců nebo příbuzných organismů, aniž by bylo nutné přesně stanovit jejich kompletní nukleotidové sekvence. Lze

pomocí nich snadno nalézt polymorfizmy v sekvencích genomové DNA způsobené mutacemi, jejichž základem jsou nukleotidové substituce (v restrikčních místech), nebo delece a inzerce nukleotidů v sekvencích, nacházejícími se mezi dvěma restrikčními místy. U klonovaných sekvencí DNA umožňuje konstrukce restrikční mapy lokalizovat geny na specifické restrikční fragmenty DNA a usnadnit tak jejich následnou izolaci a charakterizaci.

Restrikční mapy lze poměrně snadno sestavit u DNA menších velikostí, jako jsou genomy virů, organelární genomy eukaryot, molekuly plazmidů nebo jednotlivé geny prokaryot a eukaryot klonované do vektorů, u nichž lze velikost restrikčních fragmentů snadno stanovovat konvenční elektroforézou.

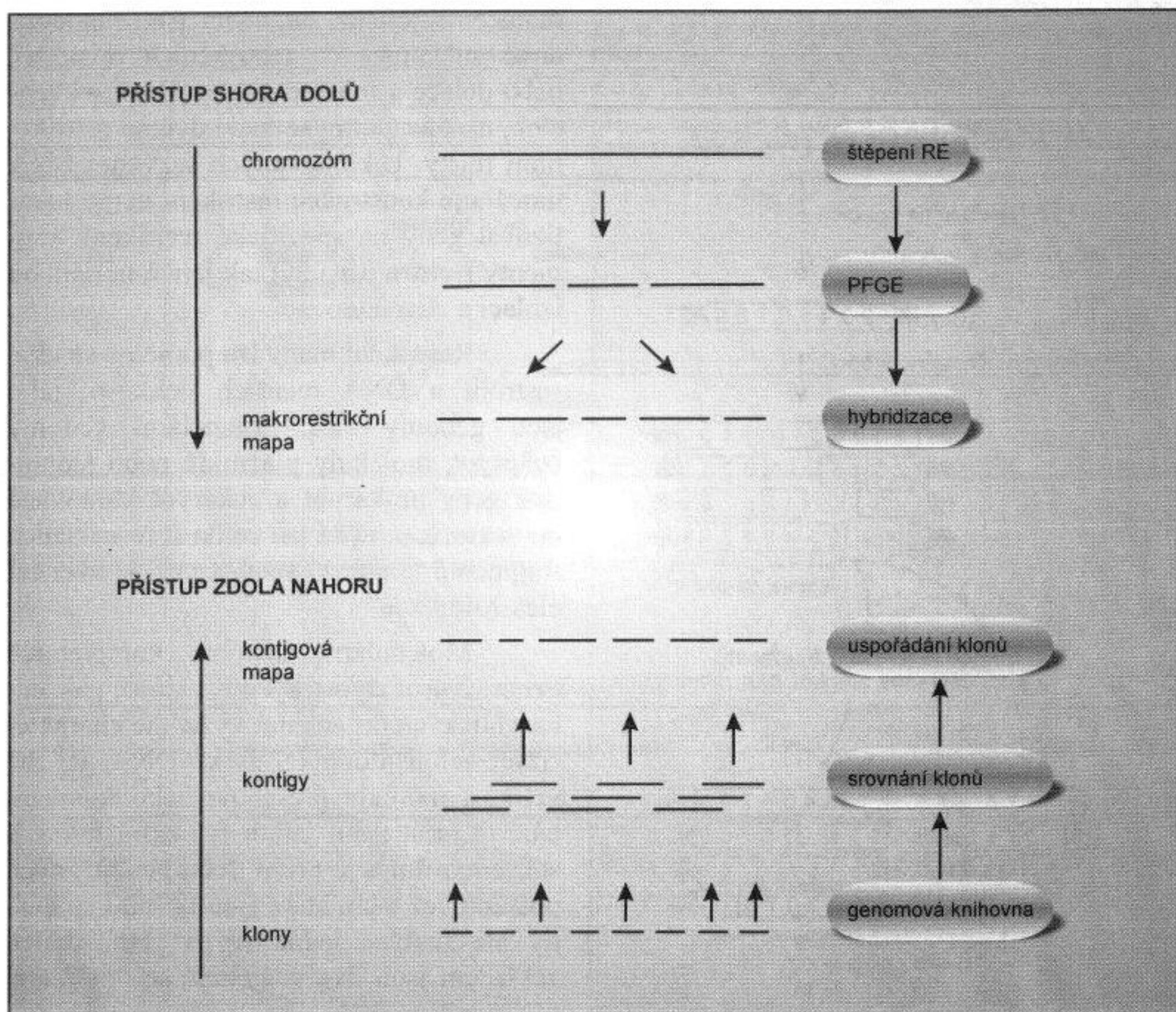
Molekulární analýza kompletních genomů prokaryotických a zvláště pak eukaryotických organismů vyžaduje charakterizaci velmi dlouhých úseků DNA, jejichž velikost mnohdy přesahuje několik megabází. K sestavení jejich fyzikální mapy a sekvencování a je proto třeba použít jiných postupů než těch, které jsou běžně využívány při analýze jednotlivých genů. Jejich základem jsou dva vzájemně se doplňující přístupy (obr. 29):

- přístup shora dolů, při němž je výchozím materiálem intaktní chromozom (např. bakteriální chromozom nebo jednotlivé eukaryotické chromozomy) a výsledkem je **makrorestrikční mapa**,
- přístup zdola nahoru, při němž se vychází z genomové knihovny klonovaných fragmentů DNA, které se postupně



Obr. 28 Restrikční mapování koncově značené DNA. Molekula DNA je linearizována enzymem *EcoRI*. Lineární molekula DNA je pak značena na 5'-koncích a částečně štěpena enzymem *AluI* (nebo by mohl být použit i enzym *HaeIII*) za vytvoření fragmentů různých délek, z nichž ty, které obsahují koncové sekvence původní molekuly DNA nesou na jednom ze svých konců radioaktivní značku. Po elektroforetické separaci je vybrán a z gelu izolován nejdelší fragment DNA a vzorek je rozdělen na dvě části. Jeden vzorek je opět částečně štěpen *AluI*, druhý vzorek je částečně štěpen *HaeIII*. Nové sady fragmentů jsou separovány v gelu a jejich poloha se identifikuje autoradiograficky. Pořadí restrikčních míst lze přímo odečíst z délek fragmentů v příslušných drahách.

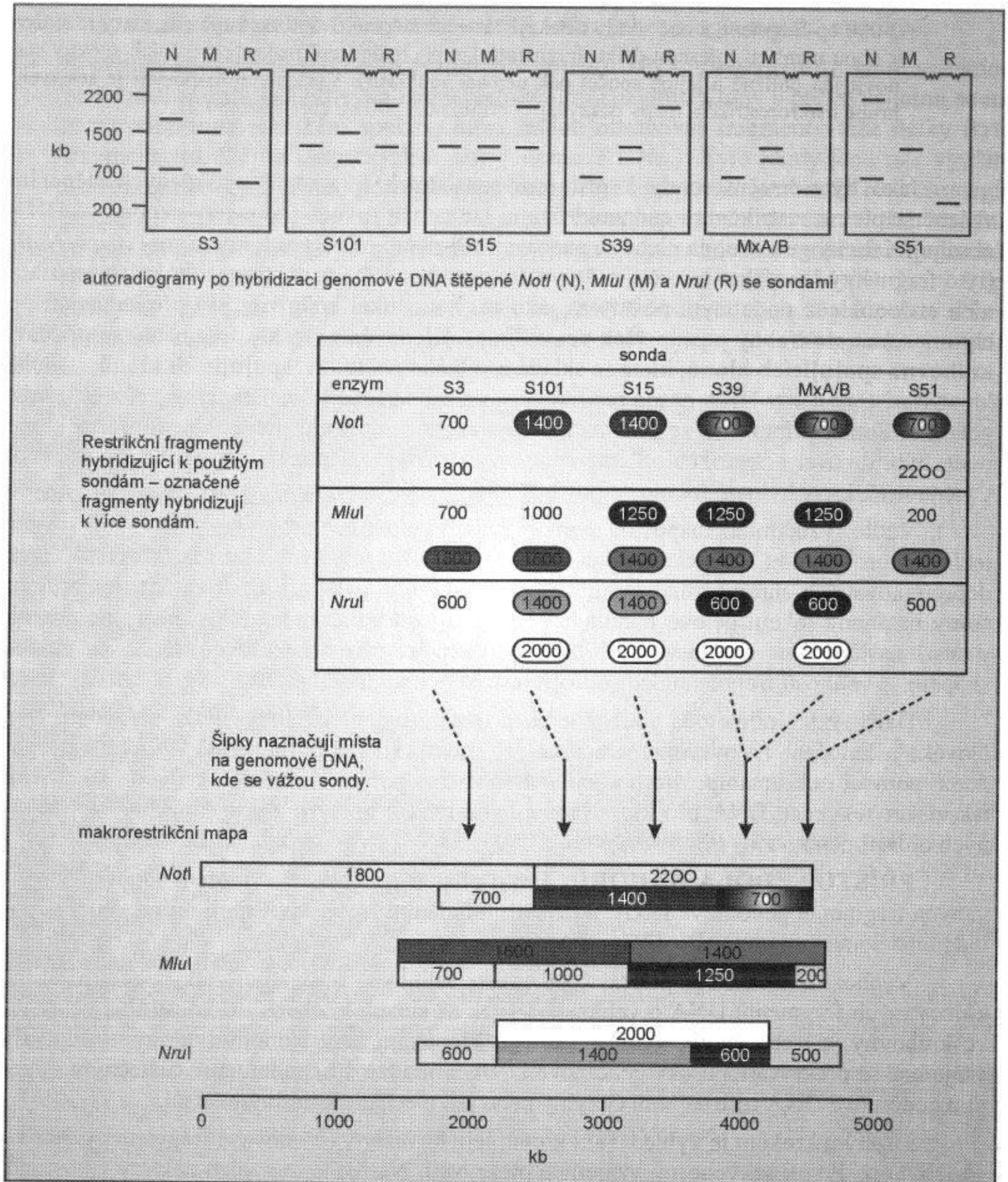
sestavují do souvislých sekvencí označovaných jako **kontigy**. Tento postup se proto označuje jako **kontigové mapování** a jeho výsledkem je fyzikální mapa tvořená souborem uspořádaných klonů (dílčích kontigů).



Obr. 29 Základní strategie pro mapování a sekvencování velkých genomů

PŘÍSTUP SHORA DOLŮ. Tento přístup je založen na přípravě velkých fragmentů DNA z neporušených chromozomů a jejich bezprostředním použití ke konstrukci restriční mapy, která je pak základem k následnému sekvencování DNA. Ke štěpení chromozomové DNA se používají vzácně štěpící restriční endonukleázy, které rozpoznávají delší a tudíž v genomu jen zřídka se vyskytující sekvence. Příkladem takových enzymů jsou např. *NotI* (rozpznávající sekvenci GCGGCCGC), *SmaI* (CCCGGG) nebo *PacI* (TTAATTAA). Štěpením DNA chromozomů těmito enzymy vznikají restriční fragmenty o velikosti stovek kilobází až několika megabází, které lze účinně rozdělit jen pulzní gelovou elektroforézou. Strategie pro sestavení restriční mapy je však odlišná od té, která se používá při mapování krátkých úseků DNA. K seřazení fragmentů se obvykle používají genově nebo sekvenčně specifické hybridizační sondy. Při použití kombinace většího počtu sond a několika restričních endonukleáz lze pak fragmenty hybridizující se stejnými sondami vzájemně seřadit (obr. 30). Restriční mapa sestavená tímto postupem s využitím pulzní gelové elektroforézy se označuje jako **makrorestrikční mapa**.

FYZIKÁLNÍ MAPOVÁNÍ DNA (GENOMU)



Obr. 30 Konstrukce makrorestrikční mapy dlouhého ramene lidského chromozomu 21. Pro mapování byly použity tři vzácně štěpící enzymy (N-*NotI*, M-*MluI*, R-*NruI*) a šest různých radioaktivně značených sond (S3, S101, S15, S39, MxA/B, S51). Zcela nahoře jsou znázorněna spektra restrikčních fragmentů, které byly rozděleny pulzní gelovou elektroforézou, hybridizovány se sondami a následně detekovány autoradiograficky. Níže jsou uvedeny velikosti fragmentů vytvořených jednotlivými enzymy, k nimž hybridizují použité sondy. Šipky označují místa vazby sondy na DNA. Z obrázku je patrné, že některé fragmenty jsou detekovány více než jednou sondou; např. sondy S101 a S15 detekují tentýž *NotI* 1 400 kb fragment. V případech, kdy dochází jen k částečnému štěpení DNA (patrně v důsledku metylace) se na autoradiogramu objevují dva pruhy, neboť sonda hybridizuje jak k fragmentu vznikajícímu úplným tak i částečným štěpením DNA. Např. sonda *MluI* S3 detekuje 700 kb fragment, S101 detekuje

1 000 bp fragment, a obě sondy detekují částečně štěpený 1 600 bp fragment, který je složen z obou menších (přesnou délku fragmentů lze při hodnocení makrorestrikčních spekter stanovit jen obtížně a jejich součet pak nemusí souhlasit). Výsledkem mapování je sestavení hrubé makrorestrikční mapy pokrývající přibližně 5 000 kb chromozomu 21.

Jako hybridizační sondy k přiřazení sousedních fragmentů vytvořených štěpením vzácně štěpicími restriktčními endonukleázami lze použít rovněž fragmenty genomové DNA obsahující úseky genomu, na nichž se nacházejí restriktční místa pro tyto enzymy (např. *NotI*) (tyto fragmenty lze získat částečným štěpením genomové DNA některou z běžných restriktčních endonukleáz podobným postupem jako při konstrukci knihovny pro přeskokování po chromozomu; podrobný postup však neuvádíme). Klonováním těchto fragmentů se připraví **knihovna spojujících klonů**, která se skládá z velkého počtu tzv. **spojujících klonů**, v nichž klonované fragmenty DNA nesou restriktční místa pro vzácně štěpicí enzymy z různých míst genomu. Sonda připravená ze sekvence klonovaného fragmentu určitého spojujícího klonu bude hybridizovat s restriktčními fragmenty, vytvořenými štěpením genomové DNA právě v tom místě, které bylo do tohoto spojovacího klonu naklonováno.

Vedle fyzikálního mapování pomocí pulzní gelové elektroforézy se vyvíjejí rovněž techniky pro přímou detekci restriktčních míst na eukaryotických chromozomech. Vzorek deproteinovaných chromozomů se umístí do roztaveného gelu, při jehož tuhnutí se chromozomy natáhnou tokem gelové tekutiny. Po štěpení restriktční endonukleázou vzniknou pak v místě naštěpení na chromozomech mezery, které lze přímo pozorovat světelným mikroskopem. Z velikostí fragmentů lze sestavit restriktční mapu.

Další fyzikální metoda použitá např. při analýze genomu *Drosophila melanogaster* a člověka je založena na mikropreparaci malých úseků (krátkých fragmentů DNA) z chromozomů pomocí mikromanipulátoru a jejich amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí. Lze tak získat sekvence DNA pro klonování a hybridizační analýzu z dosud necharakterizovaných oblastí genomu.

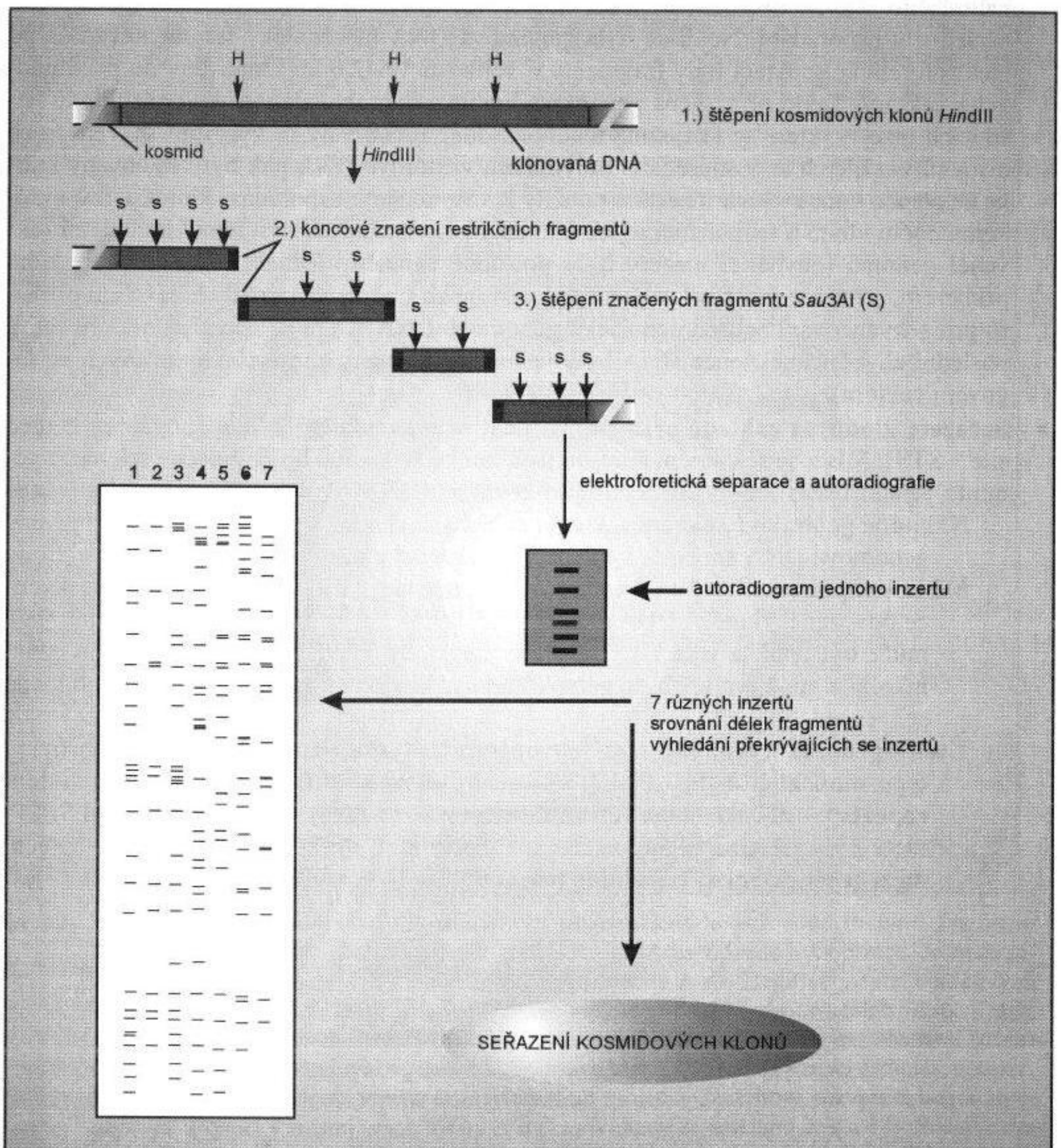
PŘÍSTUP ZDOLA NAHORU. Tento přístup spočívá ve vytvoření souboru klonovaných fragmentů genomové DNA, jejichž uspořádáním lze sestavit spojitou sekvenci odpovídající celému genomu nebo dílčím chromozomům.

Výchozím krokem je příprava genomové knihovny obsahující velký počet náhodně klonovaných fragmentů DNA o velikosti desítek až stovek kilobází. Při konstrukci genomové knihovny je třeba zvolit takovou strategii klonování, aby jednotlivé klony obsahovaly vzájemně se překrývající úseky genomové DNA. Toho lze dosáhnout např. částečným štěpením genomové DNA restriktčními enzymy nebo její mechanickou fragmentací.

Druhým krokem je vyhledávání klonů, jejichž inzerty (klonované fragmenty genomové DNA) se svými sekvencemi vzájemně překrývají. Následně je zvolen některý z postupů, který umožní vyhledat a navzájem přiřadit právě ty klony, které nesou překrývající se úseky genomu a postupně tak zpětně rekonstruovat spojitou (nepřerušenu) původní sekvenci genomové DNA. Průběžně sestavované dílčí spojitě úseky se označují jako **kontigy**. V první fázi je kontigů obvykle mnoho a odpovídají jen krátkým úsekům genomu. Se zvyšujícím se počtem charakterizovaných klonů se daří kontigy postupně navzájem spojovat jeden s druhým a tím je zvětšovat (prodlužovat). Postupné seřazování klonů se proto nazývá kontigové mapování a jeho výsledkem je sestavení **kontigové mapy** tvořené uspořádanými kontigy. Konečným kontigem je kompletní nepřerušovaná sekvence DNA chromozomu nebo celého genomu. Z tohoto důvodu je kontigová mapa formou fyzikální mapy genomu.

Pro stanovení překryvů lze použít několika různých postupů, z nichž uvádíme:

- **Srovnání spekter restričních fragmentů (otisků DNA, fingerprintů)**, které vzniknou po štěpení inzertů jednotlivých klonů restričními enzymy. Klony s překrývajícími se inzerty poskytnou restriční spektra, která budou obsahovat fragmenty téže délky (tyto fragmenty vznikají z identických úseků genomové DNA). Tyto klony jsou pak využity k sestavení kontigů. Tímto postupem byl kompletně zmapován genom *E. coli*. Strategie postupu je znázorněna na obr. 31. DNA inzert klonovaný v kosmidovém vektoru obsahuje 3 místa pro *Hind*III (H). Po štěpení tímto enzymem jsou konce restričních fragmentů radioaktivně označeny a je provedeno druhé štěpení enzymem *Sau*3AI (S), který štěpí častěji než *Hind*III. Tím je vytvořen soubor menších fragmentů, z nichž pak pouze některé budou koncově označeny. Fragmenty jsou rozděleny na polyakrylamidovém gelu

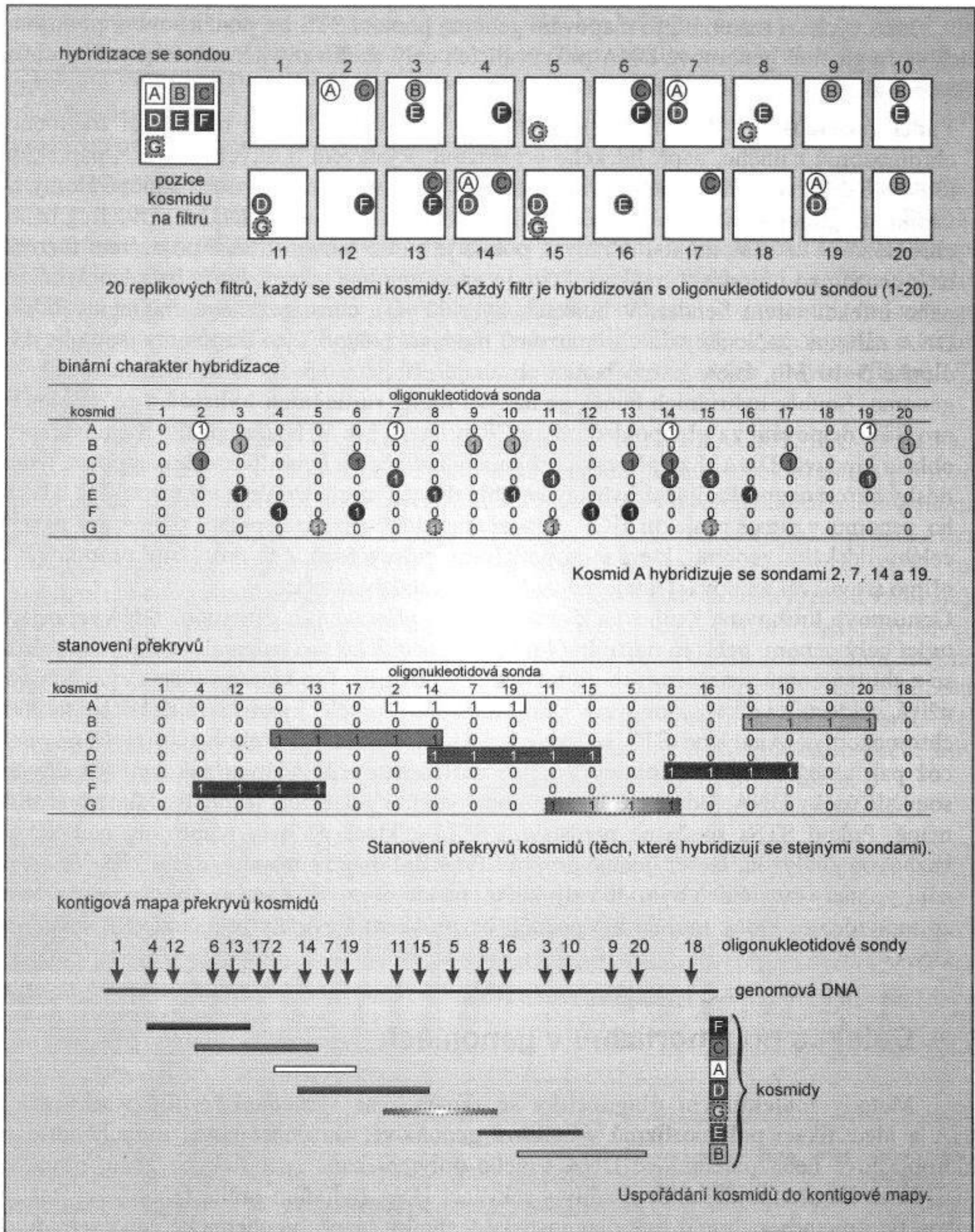


Obr. 31 Uspořádání kosmidových klonů srovnáním restričních spekter

jsou charakteristická pro každý kosmidový klon v závislosti na distribuci restričních míst *Hind*III a *Sau*3AI v jejich inzertu. Vlevo dole jsou znázorněny otisky DNA sedmi různých klonů. Klony vykazující 5 nebo více společných restričních fragmentů s velkou pravděpodobností nesou překrývající se inzerty. Srovnávání restričních spekter jednotlivých klonů a následné sestavení kontigů se provede pomocí počítačových programů.

- **Srovnání hybridizačních vzorů klonovaných fragmentů.** Připraví se velký počet krátkých uměle syntetizovaných oligonukleotidů s náhodnými sekvencemi, které se pak použijí jako sondy pro hybridizaci k DNA všech klonů genomové knihovny. Klony obsahující překrývající se inzerty klonované DNA budou hybridizovat se stejným souborem sond. Princip postupu je znázorněn na obr. 32.
- **Celogenomové sekvencování** (sekvencování bez předchozího mapování). Projekt zaměřený na sekvencování genomu bakterie *Haemophilus influenzae* byl založen na strategii náhodného sekvencování DNA klonovaných úseků bakteriálního chromozomu a jejich následném uspořádání. Nejdříve byla genomová DNA mechanicky fragmentována a po elektroforetické separaci byly fragmenty o velikosti 1,6–2,0 kb klonovány do plazmidového vektoru. Takto připravená genomová knihovna obsahovala vysoký počet klonů nesoucích inzerty, které se vzájemně mnohonásobně překrývaly. S využitím sekvenačních primerů vázajících se v sousedství polylinkeru vektorové DNA pak byly stanoveny krátké sekvence konců všech inzertů a použity k vzájemnému uspořádání klonů. Díky vysokému počtu klonů a redundanci jejich sekvencí bylo možné sestavit téměř kompletní sekvenci genomu (chybějící mezery byly postupně zaplněny jednak metodou procházení primerem, při níž se koncové sekvence klonovaných fragmentů použily k navržení primerů pro sekvencování sousedních úseků genomové DNA, které se nepodařilo klonovat, a poslední chybějící sekvence DNA byly nakonec stanoveny z inzertů klonovaných ve fágovém vektoru).
- **Seřazení klonů na základě přítomnosti míst se sekvenční adresou** („sequence tagged site“, STS). Místa se sekvenční adresou jsou krátké (100–500 bp) jedinečné sekvence genomu, jejichž úseky lze specificky amplifikovat pomocí PCR. Jako STS lze použít:
 - **Náhodné genomové sekvence**, které pocházejí z vhodně vybraných úseků klonované genomové DNA anebo se vyhledají ze sekvencí uložených v databázích.
 - **Místa s expresní adresou** („expressed sequence tags“, ESTs). Jsou to krátké sekvence odvozené z klonů cDNA a tudíž představující sekvence strukturních genů. EST může být použita jako STS za předpokladu, že je odvozena z jedinečného genu, nikoliv z genů patřících do genové rodiny, které mají stejné nebo velmi podobné sekvence.
 - **Úseky genomu vyznačující se sekvenčním polymorfismem**, např. polymorfizmy typu minisatelitů (SSLP, VNTR) nebo mikrosatelitů (STRs, „simple tandem repeats“ – di-, tri- nebo tetranukleotidové repetice). Zvláště cenné jsou SSLP, které byly již zmapovány vazbovou analýzou a představují tak přímé propojení mezi genetickými a fyzikálními mapami.

FYZIKÁLNÍ MAPOVÁNÍ DNA (GENOMU)



Obr. 32 Kontigové mapování s využitím náhodných oligonukleotidových sond (binární fingerprinting): přiřazení klonovaných fragmentů genomové DNA na základě hybridizace. Je analyzováno celkem 7 kosmidových klonů označených písmeny A–G. Nejdříve jsou z jednotlivých klonů izolovány DNA, které jsou uspořádaně naneseny na 20 hybridizačních filtrů. Každý z filtrů je pak jednotlivě hybridizován s připravenými oligonukleotidovými sondami (označené čísly 1 až 20). Pozitivní výsledek hybridizace klonu k sondě se označí číslicí 1, negativní reakce číslicí 0. Klony, jejichž inzerty obsahují společné genomové sekvence, budou hybridizovat s týmiž sondami (např. klony A a C hybridizují se sondami č. 2 a 14). Stanovením znaků 1 a 0 pro každý klon lze klony uspořádat. Významným rysem tohoto typu analýzy je automatizace založená na počítačovém zpracování hybridizačních údajů.

Jako výchozí materiál pro mapování genomu pomocí STS lze použít soubor překrývajících se fragmentů genomové DNA pokrývajících celý studovaný genom nebo určitý chromozom. Takovým souborem může být:

1. **Panel radiačních hybridů.** Radiační hybrid je hlodavčí buňka obsahující fragmenty chromozomů z jiného, např. lidského organismu. Vystavení lidských buněk X-paprskům (3 000–8 000 rad) nebo rentgenovému záření vyvolá v chromozomech náhodné zlomy za vzniku fragmentů různé délky. Ozáření má na lidskou buňku letální vliv, fragmenty chromozomů se však mohou udržovat, pokud je buňka bezprostředně po ozáření fúzována s neozářenou hlodavčí buňkou. Fúze je navozena buď chemicky polyetylenglykolem nebo infekcí virem Sendai. V buňkách hybridů jsou chromozomové fragmenty lidské DNA náhodně začleněny do chromozomů hlodavčí buňky. Tyto fragmenty jsou obvykle dlouhé 5–10 Mb, takže každá buňka obsahuje přibližně 15–35 % ekvivalentu lidského genomu. Soubor hybridních buněk se nazývá **panel radiačních hybridů** a může sloužit pro STS mapování za předpokladu, že PCR primery pro STS neamplifikují ekvivalentní oblasti hlodavčí DNA. Lze připravit též panely radiačních hybridů obsahující pouze jeden lidský chromozom. Radiační hybridy se staly důležitým materiálem při mapování lidského genomu v rámci projektu HGP. V současné době jsou k dispozici standardní panely celého lidského genomu, které jsou používány celosvětově, což umožňuje propojovat a přímo srovnávat mapovací údaje získané v různých laboratořích.
2. **Genomová knihovna.** Knihovna klonů může být připravena z genomové DNA reprezentující celý genom, nebo to může být knihovna specifická pro jeden chromozom (vychází se z chromozomů separovaných průtokovou cytometrií). Pro klonování se s výhodou používá vektorů s velkou klonovací kapacitou (např. umělé kvasinkové nebo bakteriální chromozomy). Analýzou STS se vyhledají klony obsahující překrývající se fragmenty, což pak umožní sestavit kontigy a jejich následným uspořádáním pak vytvořit dlouhé souvislé úseky DNA. Údaje o STS se potom využijí k lokalizaci těchto úseků na fyzikální mapě. Pokud STSs současně představují SSLPs, které již byly mapovány genetickou vazbovou analýzou, lze vzájemně propojit fyzikální mapu s mapou genetickou. Ve srovnání s panely radiačních hybridů mají knihovny klonů pro STS mapování přednost v tom, že individuální klony mohou být později bezprostředně využity pro stanovení sekvence DNA.

2. Detekce polymorfizmů v genomech

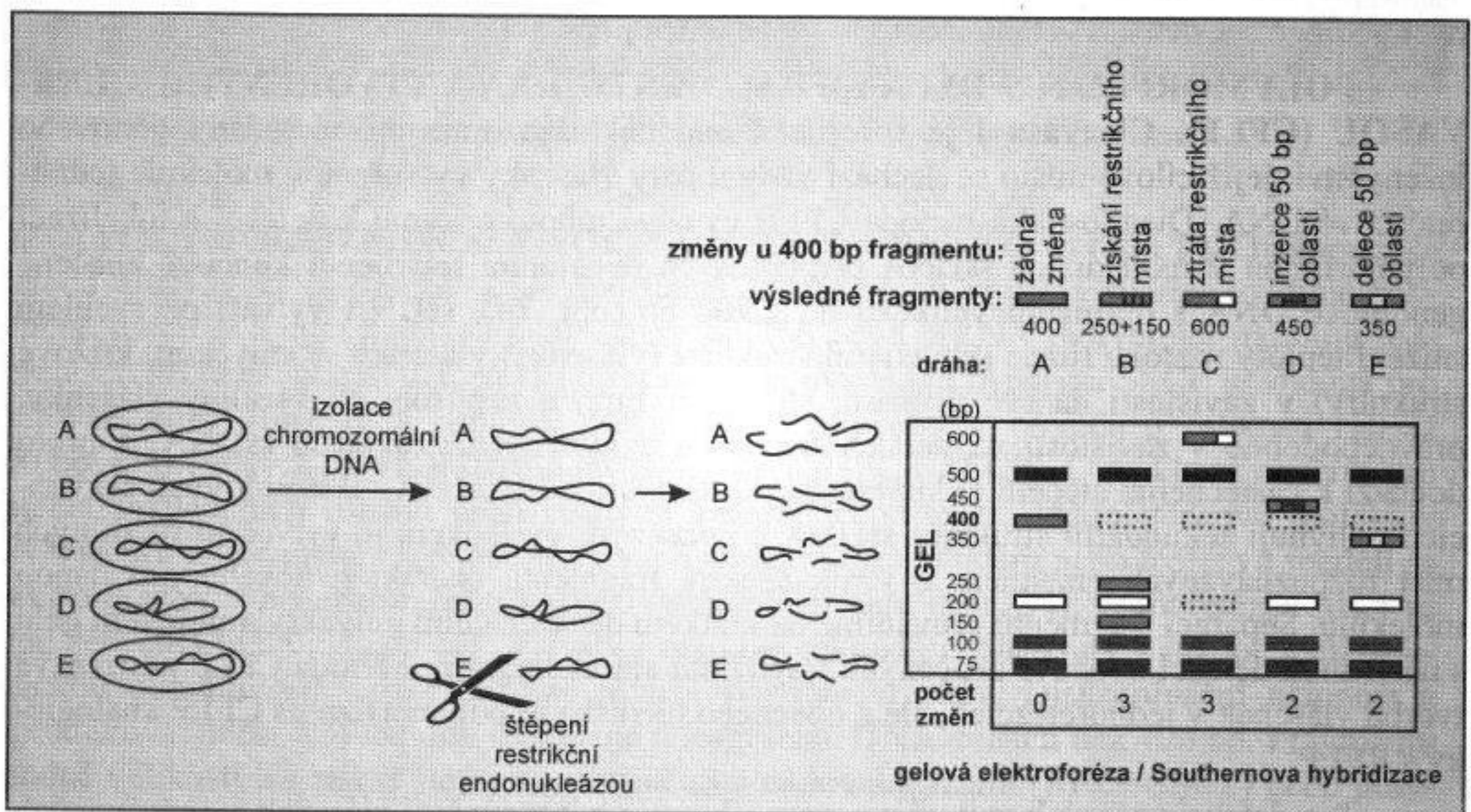
Metody **molekulární diagnostiky** se zaměřují na vyhledání rozdílů v sekvencích DNA a identifikaci polymorfizmů v celkové genomové, chromozomové, mitochondriové, chloroplastové nebo plazmidové DNA a nebo polymorfizmů specifických genů, případně jejich částí. Za předpokladu, že rozdíly v sekvenci DNA ovlivňují určité fenotypové znaky, mohou tyto metody nahradit jiné diagnostické techniky (např. biochemické nebo sérologické). Záměrem použití jednotlivých metod je zpravidla **identifikace** nebo **typizace** studovaných vzorků, které mohou poskytnout informace důležité pro rozlišení jedinců, léčbu choroby, vyhledání zdroje patogenních organismů, provedení preventivních opatření anebo fylogenetické studie. Metody založené na analýze DNA mají na rozdíl od fenotypových metod 100% typovatelnost, protože všechny organismy DNA obsahují. Genotypové diagnostické metody jsou rychlé a často nevyžadují předchozí kultivaci buněk.

Pro studium sekvenčního polymorfizmu DNA mohou být použity **přímé metody**, při nichž se přímo stanovuje sekvence variabilní oblasti DNA (kapitola V.). Tyto metody jsou však časově náročné a často nevhodné pro rutinní provádění. Častěji se proto používají

nepřímé metody, kterými lze zobrazit profil DNA konkrétního organismu ve formě **otisku DNA (fingerprintu)**. Otisky DNA mohou mít podobu spekter restričních fragmentů nebo produktů PCR rozdělených gelovou elektroforézou, případně spekter restričních fragmentů hybridizujících ke specifické sondě. Výsledné vzory mohou být hodnoceny vizuálně nebo analýzou obrazu s použitím výpočetní techniky.

Nepřímé metody se rozdělují na techniky založené na amplifikaci DNA (kapitola VI.) a na techniky, u kterých se amplifikace neprovádí; mezi ně řadíme **restriční endonukleázovou analýzu (REA)** a **selektivní hybridizaci restričních fragmentů (SRFH)** ke specifickým sondám. Samostatnou skupinu potom tvoří techniky využívající rozdílnou elektroforetickou pohyblivost fragmentů DNA obsahujících standardní a mutantní varianty genu, které umožňují identifikaci **konformačních polymorfizmů** nukleových kyselin a techniky s vysokou rozlišovací schopností pro detekci **jednonukleotidových polymorfizmů (SNP)** (str. 69).

POLYMORFIZMUS DÉLKY RESTRIČNÍCH FRAGMENTŮ (RFLP). Při analýze genomu lze využít rozdílů v restričních mapách jedinců téhož druhu. Tyto rozdíly, podmíněné různou délkou a počtem restričních fragmentů vytvořených štěpením genomové DNA (nebo její části) určitou restriční endonukleázou, se označují jako polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP). Jejich podstatou jsou buď mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích míst pro restriční endonukleázy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, delecí, inzercí nebo přestaveb ve specifických oblastech chromozómů (obr. 33). Rozdíly ve velikosti restričních fragmentů u různých jedinců lze snadno detekovat gelovou elektroforézou, která může být doplněna Southernovou hybridizací se sondami specifickými pro polymorfni oblasti genomu. Selektivní hybridizace umožní snazší interpretaci výsledků analýzy RFLP snížením počtu srovnávaných fragmentů, které lze využít i jako signální znaky při mapování genomu.



Obr. 33 Analýza polymorfizmů délek restričních fragmentů chromozomové DNA

Při analýze prokaryotického genomu metodami selektivní hybridizace restričních fragmentů se využívají:

- sondy připravené z náhodně vybraných sekvencí,
- sondy specifické pro esenciální geny nebo geny kódující faktory virulence u patogenů,
- sondy odvozené z vícekopiových elementů typu inzerčních sekvencí, transpozonů nebo jiných repeticí,
- sondy připravené z genů pro 16S rRNA nebo 23S rRNA (**ribotypizace**).

Pro eukaryotické genomy mohou být využity:

- jednolokusové sondy hybridizující k různým hypervariabilním oblastem genomu,
- mnoholokusové sondy hybridizující k repetitivním sekvencím (**minisatelitům**),
- sondy připravené ze sekvencí transpozonů a retrotranspozonů.

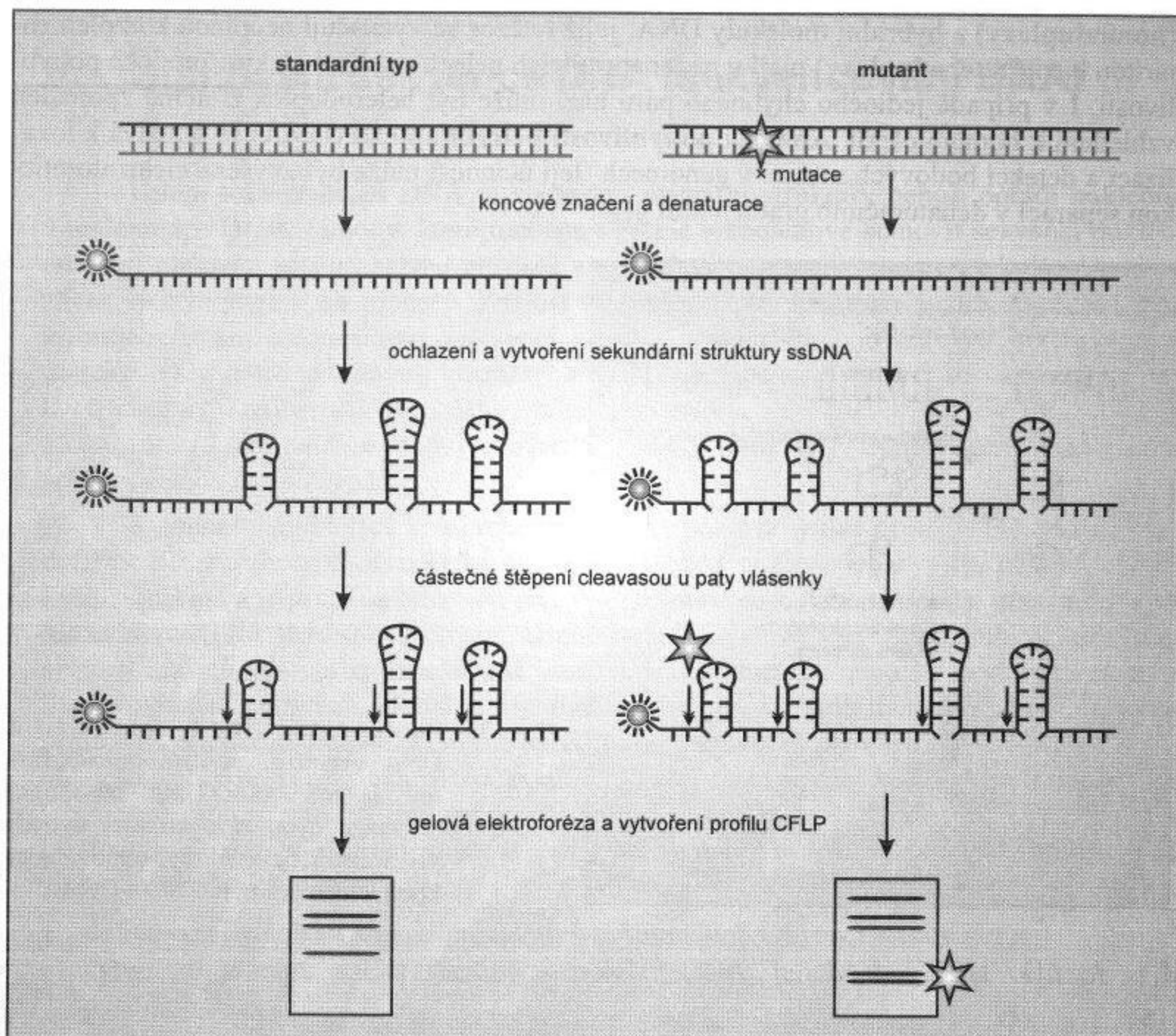
POLYMORFIZMUS DÉLKY AMPLIFIKOVANÝCH FRAGMENTŮ (AFLP).

Jedná se o rozdíly v délce amplifikačních produktů vznikajících při použití některých variant polymerázové řetězové reakce (např. AP-PCR, REP-PCR, Alu-PCR, ITS-PCR, SRFA). Podstatou tohoto polymorfizmu jsou změny v sekvencích DNA pro vazebná místa primerů nebo delece a inserce v amplifikovaných sekvencích. V užším slova smyslu je označení AFLP používáno také pro jednu z typizačních metod, která využívá selektivní amplifikaci souboru fragmentů DNA vytvářeného štěpením restričními endonukleázami (str. 102). Stanovení AFLP je vhodné pro účely srovnávací typizace celkových genomových DNA a zpravidla nevyžaduje znalosti sekvencí pro hybridizaci univerzálních primerů.

Metody PCR, kterými byl stanoven polymorfizmus AFLP můžeme použít rovněž pro stanovení **polymorfizmu délky fragmentů DNA s jednoduchou repeticí (SSLP)**. Rozdíly v délce fragmentů genomové DNA jsou v tomto případě podmíněné přítomností krátké tandemové repetice (např. **mikrosatelitu**). V důsledku mutací nebo rekombinace se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit. Polymorfizmy SSLP se používají k odlišení blízké příbuzných jedinců a k detekci vztahů mezi nimi v genetice populací.

POLYMORFIZMUS DÉLKY FRAGMENTŮ DNA VYTVOŘENÝCH CLEAVASOU (CFLP). *Cleavasa I* je specifická endonukleáza upravená metodami genového inženýrství, jejíž cílové místo se nachází vždy u paty vlásenky vytvořené v molekule jednořetězové DNA. Diagnostická metoda CFLP využívá tohoto enzymu k detekci a lokalizaci polymorfizmů v molekulách ssDNA připravených denaturací fragmentů koncově značené genomové DNA s optimální velikostí do 2 700 bp (obr. 34). ssDNA vytváří po rychlém snížení teploty roztoku různé sekundární struktury (vlásenky, vlásenky se smyčkou, křížové struktury) v závislosti na své primární struktuře. Enzym nepůsobí na všechny vlásenky, pravděpodobně v závislosti na dalších faktorech ovlivněných strukturou ssDNA, a proto dochází k částečnému štěpení jednořetězců. Mutace a modifikace v nukleotidových sekvencích ovlivňují sekundární strukturu ssDNA a konečným výsledkem je vytvoření rozdílných míst rozpoznávaných enzymem a vznik spektra fragmentů charakteristického pro danou molekulu. Separaci fragmentů provádíme na krátkém denaturačním polyakrylamidovém gelu s následnou detekcí koncově značených fragmentů autoradiografií. Metoda CFLP porovnává tvorbu vlásenek v jednořetězcích, ale z obecného hlediska je polymorfizmus CFLP analogický s RFLP.

Pro detekci známých mutací v genomech může být vytvoření vlásenek rozeznávaných *cleavasou I* navozeno prostřednictvím sekvencně specifických invazivních oligonukleotidů vytěsňujících část řetězce sekvencně specifických signálních sond, které indikují přítomnost cílových sekvencí. Produkty štěpení signálních sond *cleavasou* jsou potom detekovány fluorescenčními metodami nebo hmotnostní spektrometrií.

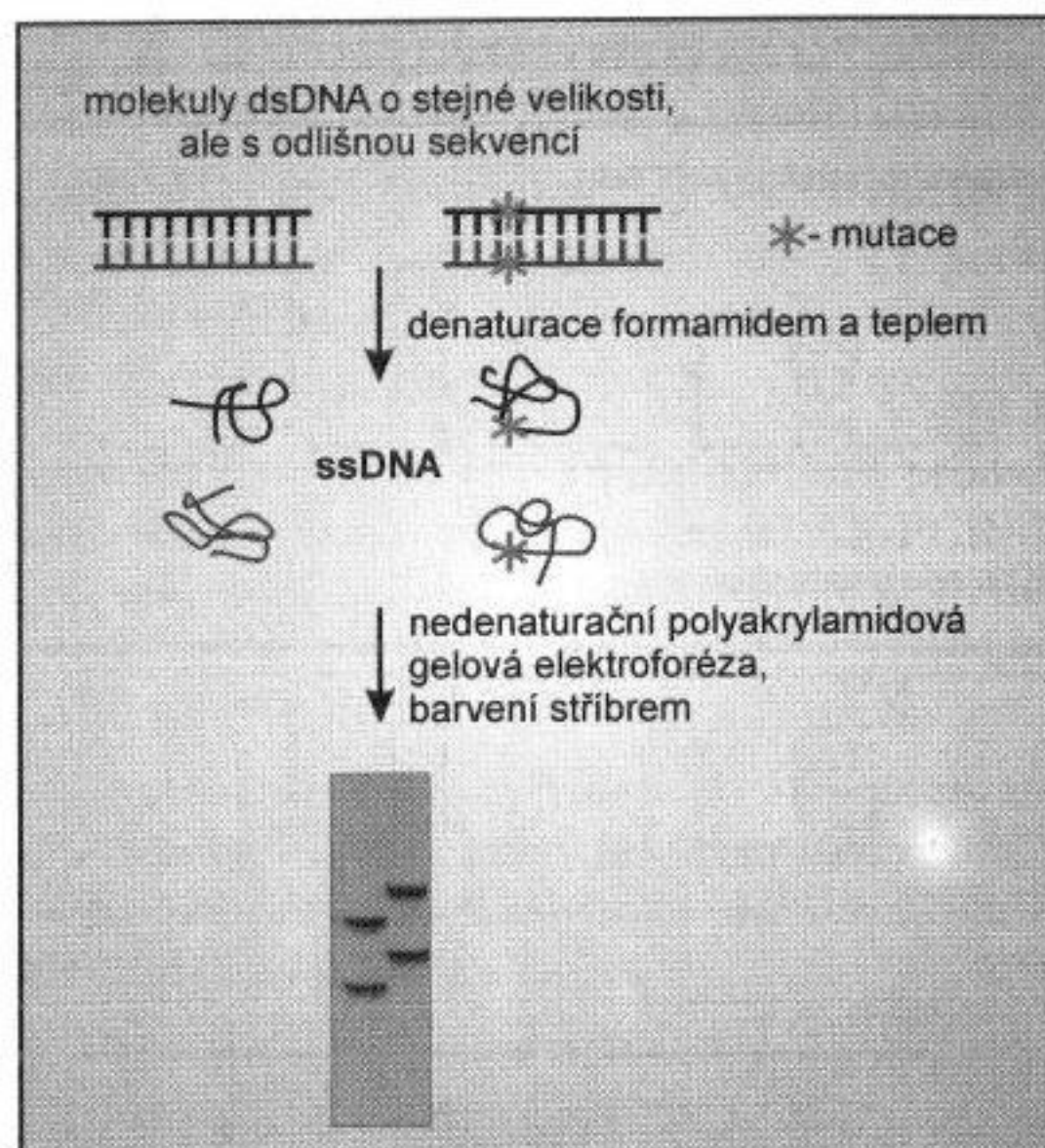


Obr. 34 Princip detekce polymorfizmu délky fragmentů DNA vytvořených cleavasou

POLYMORFIZMUS KONFORMACE JEDNOŘETĚZCŮ (SSCP). Diagnostická metoda analýzy konformačního polymorfizmu jednořetězců využívá tvorby rozdílné sekvencně specifické intramolekulární struktury ssDNA nebo ssRNA ovlivňující mobilitu jednořetězců při nedenaturujících elektroforetických podmínkách. Analýza SSCP je vhodná pro sledování změn (mutací) v krátkých úsecích DNA libovolného původu o velikosti 150 až 400 bp, připravených polymerázovou řetězovou reakcí (PCR-SSCP). Obvykle se používá pro detekci sekvencních rozdílů mezi různými alelami téhož genu. Jednořetězcové molekuly DNA se připraví denaturací dvouřetězcových molekul formamidem nebo teplem a rozdělí se elektroforézou v nedenaturačním polyakrylamidovém gelu (obr. 35). Jednořetězce lišící se svou sekvencí byť i jedinou bází vytvářejí rozdílné sekundární struktury s různou elektroforetickou pohyblivostí, což umožňuje rozlišit polymorfni alely. Diskriminační účinnost a reprodukovatelnost této metody se snižuje u fragmentů DNA delších než 400 bp. Fragmenty vhodné velikosti lze získat štěpením restrikcími endonukleázami (RFLP-SSCP) nebo polymerázovou řetězovou reakcí.

POLYMORFIZMUS KONFORMACE DVOUŘETĚZCŮ (DSCP). Pokud jsou denaturované produkty polymerázové řetězové reakce podrobeny pomalé renaturaci, vytvářejí duplexy DNA. Duplexy, jejichž řetězce se vyznačují úplnou komplementaritou bází

(homoduplexy) a hybridní molekuly DNA, jejíž řetězce se vyznačují neúplnou komplementaritou bází (**heteroduplexy**) mají v nendenaturujících gelech rozdílné elektroforetické pohyblivosti. I v případě jediného chybného páru bází může být heteroduplex zřetelně zpomalen vzhledem k homoduplexu. **Analýza pohyblivosti heteroduplexů (HMA)** se používá k lokalizaci a detekci bodových mutací v genomech. Její účinnost může být zvýšena elektroforetickou separací v denaturačním gradientním gelu.



Obr. 35 Princip metody SSCP. Homozygotní DNA vytváří 2 elektroforetické formy, heterozygotní DNA obsahující sekvence dvou různých alel vytváří 4 elektroforetické formy, odpovídající komplementárním řetězcům DNA.

V. Stanovení sekvence DNA (sekvencování DNA)

Cílem sekvencování DNA je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Metody, které umožňují rychle a spolehlivě stanovit sekvenci nukleotidů hrají klíčovou roli v analýze genomů a umožňují lépe porozumět molekulární podstatě základních biologických procesů. Znalost **sekvence DNA** je rutinně používána k odvození informace o **aminokyselinové sekvenci** kódovaných proteinů, o regulaci jejich tvorby a umožňuje též detailně stanovit charakter mutací, které se např. projevují vznikem genetických chorob. Znalost sekvencí DNA také značně urychlila rozvoj dalších molekulárních metod, mezi které patří např. polymerázová řetězová reakce, jejíž provedení je na znalosti sekvencí DNA často závislé.

V současné době jsou k sekvencování DNA používány dvě principiálně odlišné metody. První je založena na specifické degradaci řetězců nukleových kyselin pomocí chemických sloučenin a je proto označována jako chemická metoda nebo též podle jmen autorů jako Maxamovo–Gilbertovo sekvencování. Druhá metoda využívá specifickou inhibici enzymové syntézy řetězců DNA a je označována jako enzymová metoda nebo též podle jména autora Sangerovo sekvencování. I když se obě metody svým principem diametrálně liší, je v obou případech základním požadavkem pro zahájení sekvencování příprava molekul DNA s přesně definovanými konci. Nejčastěji používaným výchozím materiálem pro sekvencování DNA jsou proto restriční fragmenty, naklonované ve vhodném klonovacím vektoru, nebo fragmenty získané PCR. Společným rysem obou metod je rovněž splnění několika technologických požadavků:

- definování jednoho z konců fragmentu DNA, u něhož sekvenci stanovujeme,
- vytvoření souboru jednořetězcových molekul DNA, jejichž vzájemná velikost se liší o jedinou bázi,
- rozdělení tohoto souboru fragmentů elektroforézou s takovou rozlišovací schopností, která umožňuje navzájem oddělit řetězce DNA lišící se svou délkou o jedinou bázi.

Poslední fáze sekvencování spočívá ve vyhodnocení získaných sekvencí. To se již neobejde bez využití počítačů a speciálních programů, kterými lze stanovené sekvence komplexně analyzovat. Při této analýze se provádí:

- vyhledání otevřených čtecích rámců, které mohou být potenciálními geny,
- vyhledání exonů a intronů a převedení sekvence nukleotidů do sekvence aminokyselin v proteinech,
- vyhledání známých motivů na DNA, charakteristických pro regulační oblasti,
- vyhledání repetitivních sekvencí,
- vyhledání rozpoznávacích míst pro restriční enzymy, čímž se získá kompletní restriční mapa,
- srovnání stanovené sekvence nukleotidů nebo z ní odvozené sekvence aminokyselin se sekvencemi uloženými v databankách, v nichž se shromažďují údaje získané v laboratořích celého světa.

CHEMICKÁ METODA SEKVENCOVÁNÍ DNA (MAXAMOVO–GILBERTOVO SEKVENCOVÁNÍ). Podstatou chemické metody sekvencování je specifické rozštěpení molekuly DNA chemickými činidly v místech, kde je lokalizována báze určitého typu. Výchozím materiálem je soubor identických fragmentů jednořetězcové DNA označených na jednom konci radioaktivní značkou. Každý ze čtyř typů bází v molekule DNA lze určitým

způsobem modifikovat tak, aby bylo v tomto místě možno dosáhnout přerušení řetězce DNA. Mezi chemikálie používané pro navození modifikací bází patří dimetylsulfát, hydroxid sodný, kyselina mravenčí a hydrazin (Tabulka 2). Podmínky reakce se zvolí tak, aby byla poškozena v průměru pouze jedna báze v řetězci. Výsledkem modifikace a nakonec i eliminace báze je vytvoření křehkého místa v řetězci DNA, které je velice citlivé ke štěpení. Poté je DNA za vysoké teploty vystavena působení **piperidinu**, což vede k rozštěpení řetězce v zeslabených místech. Reakce je prováděna ve velkém souboru molekul, proto je výsledkem štěpení soubor fragmentů DNA všech různých délek, které odpovídají vzdálenosti bází příslušného typu od značeného konce výchozí molekuly DNA. Postup sekvencování probíhá v následujících krocích (obr. 36):

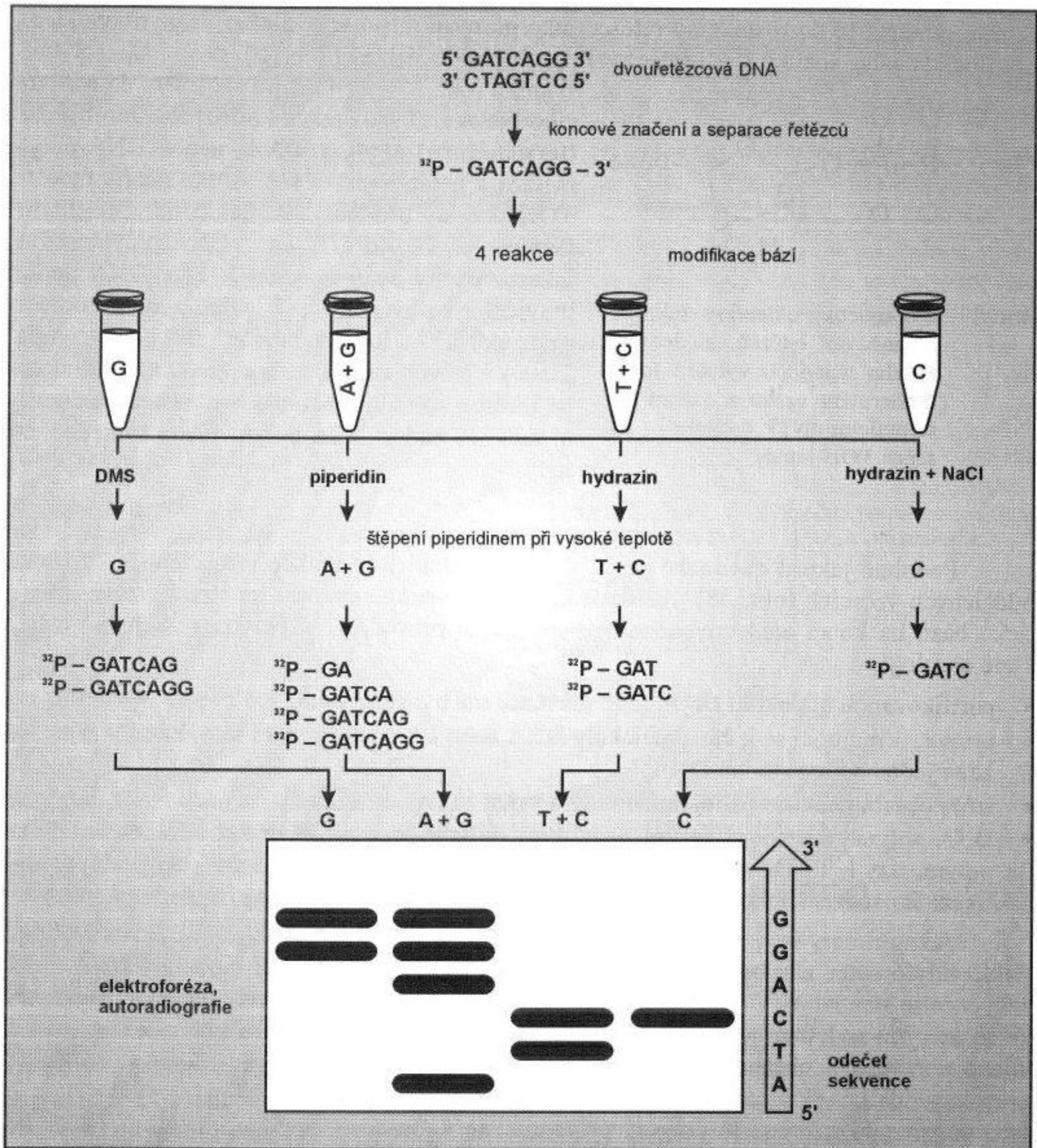
- příprava značených jednořetězcových fragmentů DNA, jejichž sekvence má být stanovena,
- rozdělení souboru fragmentů DNA do čtyř vzorků,
- působení chemickou látkou, která specificky modifikuje jeden nebo dva typy bází DNA u každého vzorku,
- působení další chemické látky, které vede k rozštěpení řetězců DNA ve všech místech, v nichž byly báze modifikovány,
- rozdělení fragmentů DNA elektroforézou v denaturujícím polyakrylamidovém gelu; vzorky z každé ze čtyř reakcí jsou na gel nanášeny vedle sebe v definovaném pořadí,
- autoradiografická detekce fragmentů; detekovány budou pouze ty fragmenty DNA, které nesou označený konec,
- stanovení sekvence DNA z autoradiogramu odečtem poloh pruhů v jednotlivých drahách.

Maxamovo–Gilbertovo sekvencování není rutinně používáno z několika důvodů. Data produkovaná chemickým sekvencováním bývají častěji nejednoznačná než u enzymového sekvencování, protože reaktivita chemických činidel je ovlivněna různými nečistotami. Dalším důvodem je nutnost používat radioaktivní značení konců přinášející vysokou úroveň radioaktivity. V porovnání s enzymovým sekvencováním poskytuje chemické relativně kratší sekvence a postup pro jejich získání je laboratorně náročnější.

Tabulka 2 Chemické modifikace bází používané při Maxamově–Gilbertově sekvencování

Báze	Specifická modifikace
G	Metylace dusíku N ⁷ dimetylsulfátem při pH 8,0 způsobuje, že vazba C ⁸ –C ⁹ je citlivá ke štěpení.
A + G	Piperidin při pH 2,0 zeslabuje glykosidovou vazbu adeninu a guaninu protonací dusíkových atomů v purinových cyklech.
C + T	Hydrazin otevírá pyrimidinové cykly, které recyklují do pětičlenných, citlivých ke štěpení.
C	Hydrazin za přítomnosti NaCl (1,5 M) reaguje pouze s cytozinem.
A > C	Hydroxid sodný (1,2 N) při 90 °C způsobuje silné štěpení u A a slabé štěpení u C.

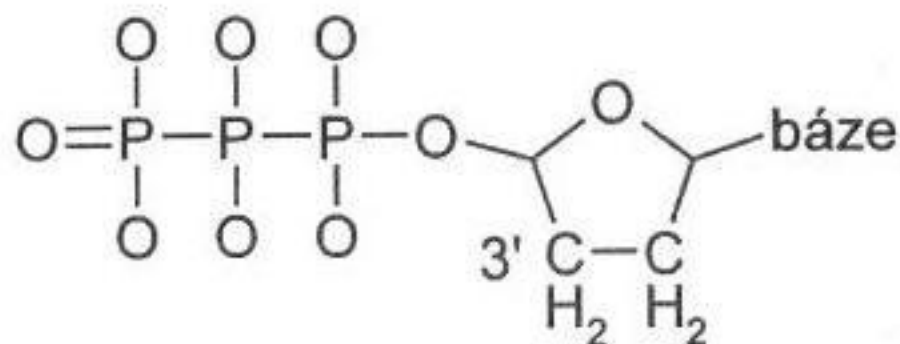
STANOVENÍ SEKVENCE DNA (SEKVENCOVÁNÍ DNA)



Obr. 36 Chemické sekvenování DNA podle Maxama a Gilberta

ENZYMOVÁ METODA SEKVENOVÁNÍ (SANGEROVO SEKVENOVÁNÍ). Enzymová metoda sekvenování je v současné době nejběžnější metodou sekvenování DNA. Vyvinula se z techniky označené **sekvenování + / -**, která poprvé využila prodloužení primeru DNA-polymerázou a její specifické zakončení, avšak byla poměrně málo přesná. Při sekvenování Sangerovou metodou je DNA, jejíž sekvence má být stanovena, použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky prostřednictvím DNA-polymerázy. Metoda využívá několika vlastností DNA-polymerázy: schopnosti vytvářet přesné kopie molekuly DNA a schopnosti specifické syntézy řetězce DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ od primeru s volnou 3'-OH skupinou. Syntéza řetězce na matricové DNA je zahájena od místa, ke kterému je připojen sekvenčně specifický primer pro sekvenování, a ukončena

v místě, v němž je do rostoucího řetězce inkorporován místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog **2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfát** (ddNTP), postrádající 3'-OH



Obr. 37 2',3'-dideoxynukleotidy inkorporované do řetězců nukleových kyselin nemohou vytvořit fosfodiesterovou vazbu s dalším přístupujícím dNTP v důsledku absence 3'OH-konce

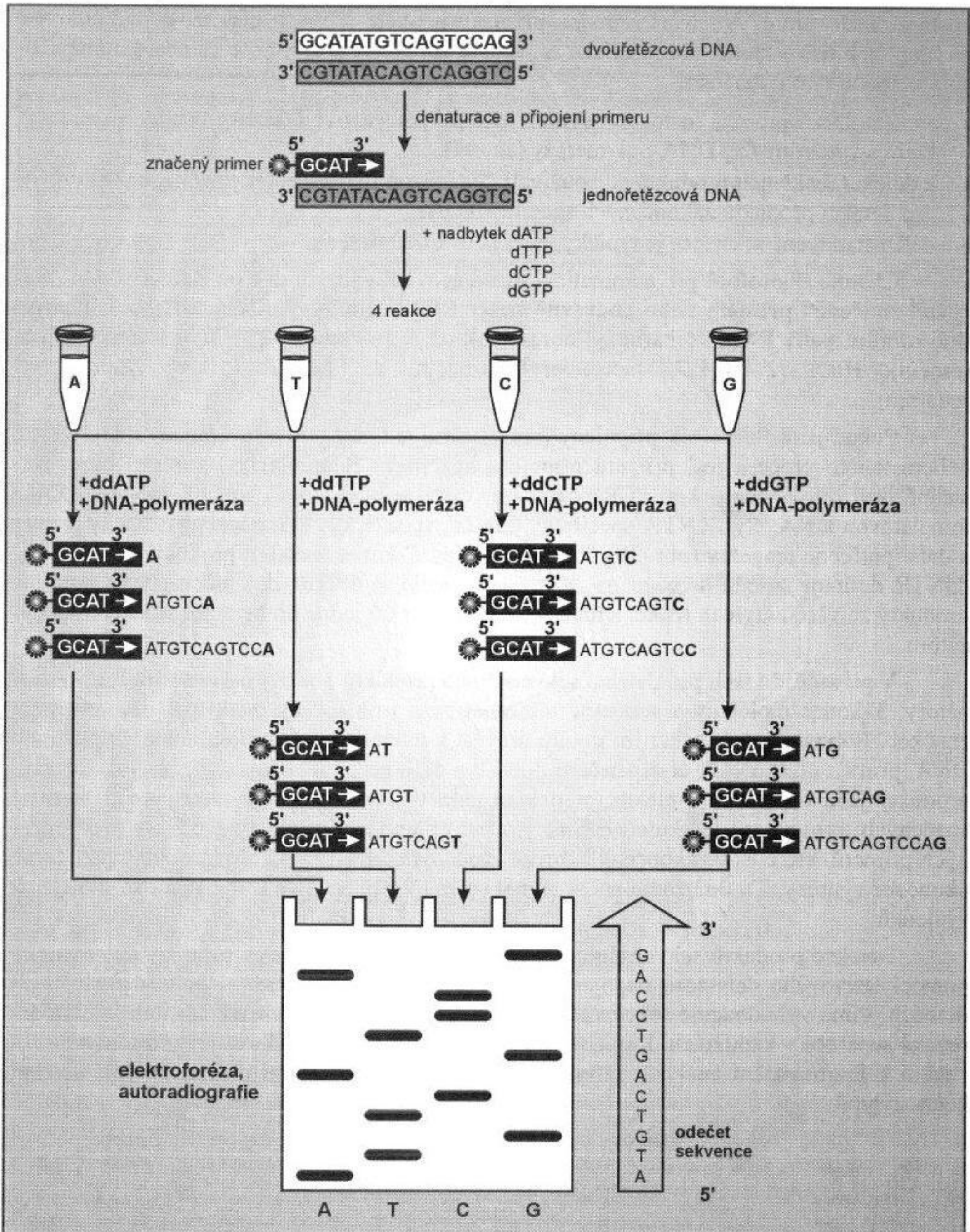
skupinu (obr. 37). Ten má po začlenění do rostoucího řetězce DNA funkci **koncového inhibitoru (terminátoru) syntézy DNA**, neboť DNA-polymeráza k němu nemůže v důsledku nepřítomnosti 3'OH-skupiny připojit další nukleotid. Důležitým faktem je, že ddNTP jsou DNA-polymerázou inkorporovány do rostoucího řetězce DNA podle pravidel o párování bází. Vhodně zvolený poměr mezi ddNTP a odpovídajícím dNTP (zpravidla 1:100) v reakční směsi rozhoduje o tom, jak dlouhé řetězce, náhodně zakončené v místech začlenění ddNTP, budou DNA-polymerázou syntetizovány.

Podobně jako u chemické metody sekvencování jsou reakce prováděny ve čtyřech oddělených vzorcích (obr. 38). Každá reakce je určena ke stanovení relativní pozice specifické báze na konci analyzovaného řetězce. To je provedeno přípravou reakčních směsí, které obsahují:

- purifikovanou molekulu DNA, jejíž sekvence má být stanovena,
- primer, připojující se k části molekuly DNA nebo k místu připojení na vektoru v případě, že se jedná o klonovanou DNA,
- směs obsahující 4 normální nukleotidy a jeden ze čtyř ddNTP,
- DNA-polymerázu (používají se různé typy polymeráz, např. Klenowův fragment DNA-polymerázy I, T7 DNA-polymeráza zbavená 3'-exonukleázové aktivity chemickou modifikací označovaná jako **SequenaseTM**, zpětná transkriptáza nebo *Taq* DNA-polymeráza).

Jako primery lze použít krátké restriční fragmenty nebo synteticky připravené oligonukleotidy o délce zhruba 18 bází, které jsou komplementární k části molekuly DNA, jejíž sekvence se stanovuje. V případě sekvencování produktů PCR je možné použít stejné primery se kterými byl fragment DNA amplifikován. Řada vektorů je pro účely sekvencování cíleně upravena a obsahuje obvykle po obou stranách mnohočetného klonovacího místa krátké specifické sekvence, k nimž se připojují **univerzální sekvenační primery**. Příkladem jsou univerzální sekvenační primery připojující se v sousedství mnohočetného klonovacího místa vektorů odvozených z bakteriofága M13mp18 nebo M13mp19, které umožňují sekvencovat oba řetězce naklonované DNA, aniž bychom potřebovali znalosti o části analyzované sekvence pro účely připojení primeru. Pro umožnění detekce nově syntetizovaných řetězců je primer, ddNTP nebo jeden ze čtyřech dNTP radioaktivně a nebo neradioaktivně označen. Po proběhnutí polymerizační reakce se vytvořené produkty denaturují a separují na polyakrylamidovém denaturujícím gelu podobně jako při chemické metodě. Rovněž odečet sekvence z autoradiogramu nebo hybridizační membrány u neradioaktivního značení primeru je obdobný. Při manuálním provádění Sangerova sekvencování je možné stanovit sekvenci dlouhou přibližně 300–400 bází.

STANOVENÍ SEKVENCE DNA (SEKVENCOVÁNÍ DNA)



Obr. 38 Enzymové sekvenování DNA podle Sangera

AUTOMATICKÉ SEKVENCOVÁNÍ DNA. Významného pokroku ve stanovování sekvencí DNA enzymovou metodou bylo dosaženo po zavedení přístrojů pro automatické sekvenování DNA. Při něm se pro separaci reakčních produktů, detekci, shromáždění dat z reakce a analýzu pořadí bází používají plně automatizované aparatury. Tento přístup umožňuje stanovit a následně i zpracovat sekvence DNA mnohem rychleji než při standardních

postupech. Je proto využíván zejména při sekvenování DNA z genomových knihoven, obsahujících tisíce klonů. Automatické sekvenování má ve srovnání se standardní enzymovou metodou tyto odlišnosti:

- syntéza DNA probíhá metodou **asymetrické polymerázové řetězové reakce** v termocyklu s využitím *Taq* DNA-polymerázy (str. 94),
- k detekci reakčních produktů se používají čtyři různé fluorescenční značky, každá určená pro detekci produktů zakončených specifickou bází,
- délka stanovené sekvence je typicky mezi 500–1 000 bázemi.

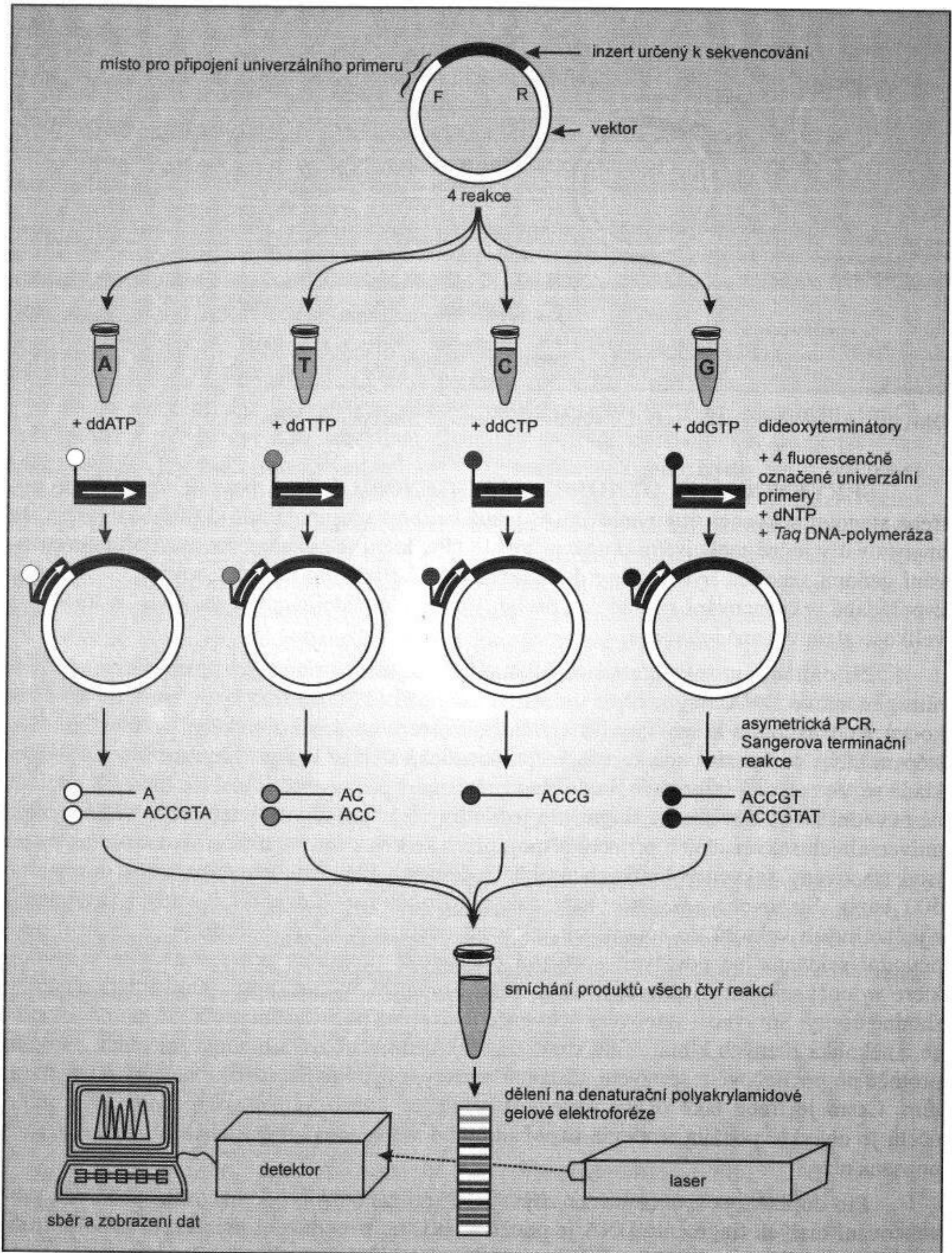
Chemie fluoroforů pro automatické sekvenování využívá dva odlišné přístupy: „**barevně značené**“ primery nebo „**barevně značené**“ terminátory. K nejčastěji používaným fluoroforům patří FAM (6-karboxyfluorescein), TET (6-karboxy-2',4,7,7'-tetrachloro-fluorescein), HEX (2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein) a TAMRA (5-karboxytetrametyl-rodamin).

Pokud jsou fluorofory připojeny k primerům, je třeba primer syntetizovat čtyřikrát a během tohoto procesu je k primeru připojena specifická fluorescenčně značená báze. Následně jsou pro asymetrickou PCR připraveny čtyři reakční směsi, z nichž každá obsahuje templátovou DNA, čtyři dNTP, specifický ddNTP, specifický fluorescenčně značený primer a další potřebné reagenty (obr. 39). Primer definuje 5'-konec molekul produktů a začleněný ddNTP definuje totožnost báze na 3'-konci. Jakmile je reakce dokončena, jsou barevné produkty ze všech čtyřech reakcí smíchány a naneseny do jedné dráhy automatického analyzátoru.

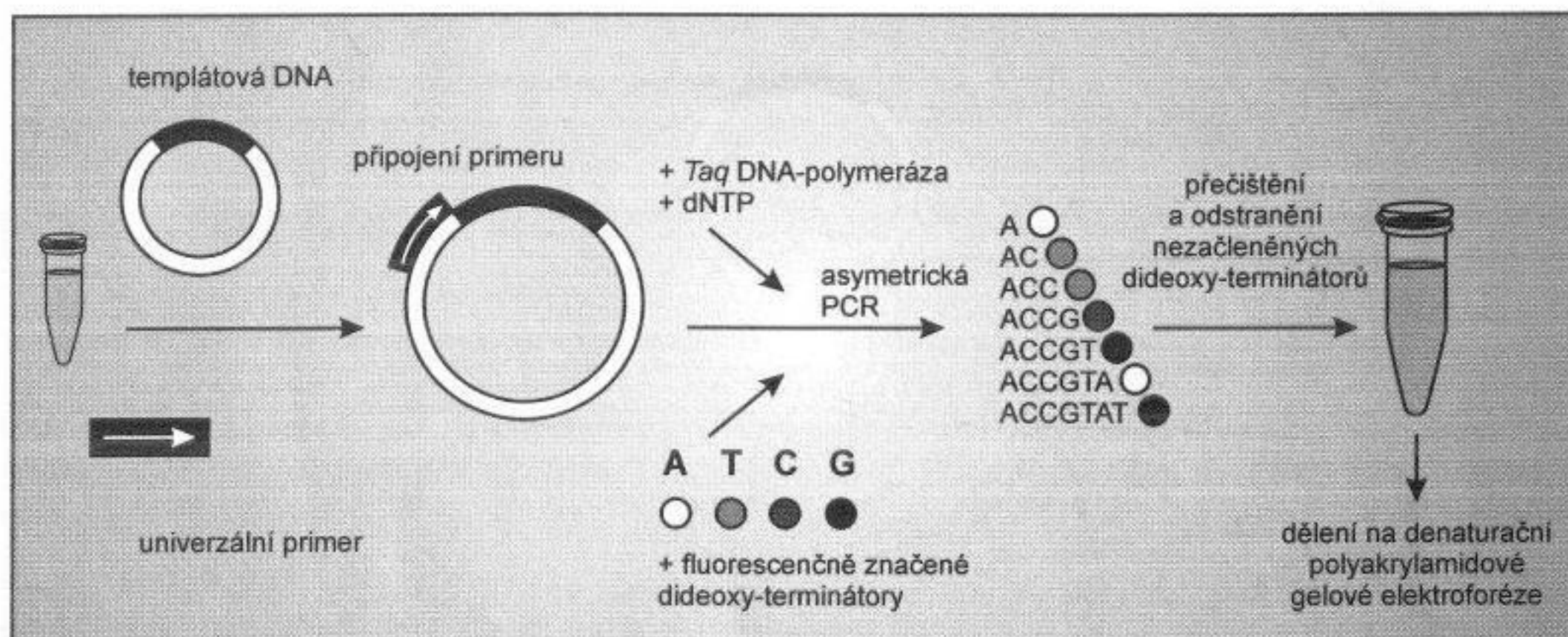
V případě, že jsou pro detekci sekvenačních produktů použity barevně značené terminátory, 3'-konec molekuly a současně totožnost báze jsou určeny příslušnou fluorescenční značkou. Polymerizační reakci lze potom provést v jedné zkumavce obsahující templátovou DNA, primer, čtyři dNTP, čtyři značené ddNTP a další nezbytné reagenty (obr. 40). Reakční produkty jsou rozděleny v elektroforetickém gelu v téže dráze. Výhodou použití barevně značených terminátorů je skutečnost, že jsou vizualizovány pouze ty produkty prodloužených primerů, které jsou zakončeny barevně značeným ddNTP a nikoliv produkty předčasně ukončené syntézy. To umožňuje snížit signály pozadí a obecně vede k získání kvalitnějších výsledků.

Detekce produktů sekvenačních reakcí probíhá v průběhu elektroforézy automaticky pomocí laserového detektoru napojeného na počítač, který z pořadí signálů v příslušných drahách přímo vyhodnocuje sekvenci DNA. U aparatur poslední generace probíhá elektroforetická separace v kapilárách. Kapilárnímu uspořádání se dává přednost při prostém sekvenování a fragmentační analýze, zatímco deskovému v molekulární diagnostice při detekci heterozygotů.

STANOVENÍ SEKVENCE DNA (SEKVENCOVÁNÍ DNA)



Obr. 39 Automatické sekvenování využívající barevné značení primerů



Obr. 40 Automatické sekvenování využívající barevné značení terminátorů

SEKVENCOVÁNÍ GENOMU (CELOGENOMOVÉ). V praxi je velmi často potřeba stanovit sekvenci fragmentu DNA, jehož velikost přesahuje 500–1 000 bází, které lze analyzovat v jedné reakci. Pro dosažení tohoto cíle, který je běžně požadován při sekvenování genomů, mohou být zvoleny dvě zcela odlišné strategie: náhodné sekvenování nebo uspořádané sekvenování sousedních úseků. Volba odpovídající strategie závisí zejména na velikosti stanovované sekvence.

Při **náhodném sekvenování** genomu jsou nejdříve připraveny mechanickým stříháním genomové DNA fragmenty s optimální velikostí (1 300–2 000 bp) a po úpravě jejich konců jsou nahodile klonovány do vhodného vektoru za vzniku velkého počtu klonů. Ke štěpení DNA se využívá sonikace nebo pankreatická DNáza I za přítomnosti Mn^{2+} . Předpokládá se, že celková informace o sekvenci obsažená v připravených malých klonech odpovídá původní DNA a sekvence fragmentů jednotlivých klonů se vzájemně překrývají. Pomocí univerzálních sekvenačních primerů připojujících se k vektoru v blízkosti klonovacího místa jsou stanoveny sekvence krátkých úseků na koncích klonovaných fragmentů (minimálně 500 bází). Stanovené sekvence jsou pak použity k uspořádání klonovaných fragmentů z jednotlivých vektorů do souvislých sekvencí genomové DNA – **kontigů**. K rekonstrukci původní sekvence se používají speciální počítačové programy pro sestavování sekvencí, které vyloučí sekvence vektorů, maskují známé repetice, vyloučí nespolehlivá data a najdou shodné úseky. Správnost stanovené sekvence je ověřena po srovnání překryvů stejné sekvence z několika různých klonů. Tato strategie však neumožní získat úplnou sekvenci genomu, protože po počítačovém sestavení zůstanou mezery, odpovídající nenaklonovaným fragmentům. Často je třeba také ověřit správnost sekvence koncových úseků genomu. K tomuto účelu je obvykle použita strategie **uspořádaného sekvenování** (procházení chromozomu) popsaná níže.

Pro doplnění sekvence mezer zbývajících po náhodném sekvenování nebo pro sekvenování malých fragmentů DNA je používán přístup **procházení primerem** nebo postupné zkracování fragmentu exonukleázou a tvorba **přilehlých delecí**.

Procházení primerem vyžaduje znalost sekvence, ke které se připojuje primer umožňující prodloužení řetězce DNA-polymerázou. Sekvence získaná z první reakce je použita pro návrh primeru pro další reakci a tento krok se opakuje, dokud není dosaženo kompletního stanovení sekvence. Tento proces nevyžaduje další klonování a minimalizuje stanovení

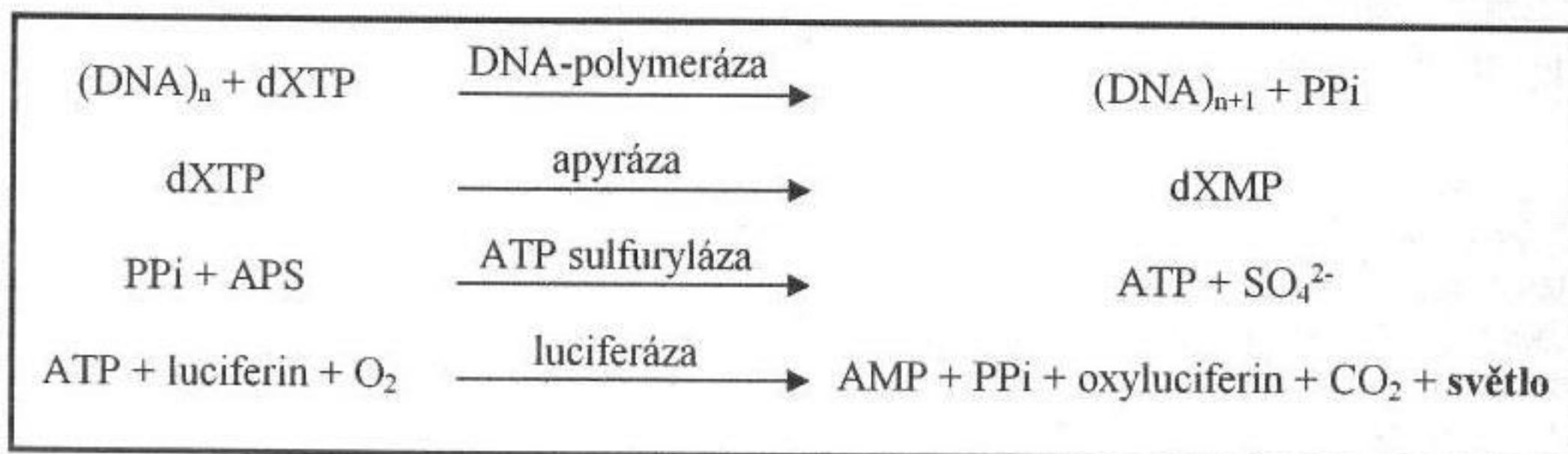
nadbytečných sekvencí, ale správnost stanovené sekvence by měla být ověřena sekvencováním obou řetězců.

Pro přípravu sady delečních mutantů s přilehlými delecemi bylo vyvinuto několik metod, které využívají specifické **exonukleázy** (*Bal31*, pankreatická DNáza I nebo exonukleáza III) postupně odštěpující více nukleotidů z jednoho nebo druhého konce cílové molekuly DNA. Fragmenty DNA s vytvořenými delecemi jsou znovu klonovány do vhodného vektoru a sekvencovány.

Uspořádané sekvencování genomu je v porovnání s náhodným mnohem pomalejší a dražší v důsledku nutnosti návrhu a syntézy nových primerů. Použití exonukleáz navíc vyžaduje značné praktické zkušenosti. Metody postupného přímého sekvencování DNA také nejsou příliš vhodné pro stanovení repetitivních sekvencí.

HYDROGENSIŘIČITANOVÉ GENOMOVÉ SEKVENCOVÁNÍ. U obratlovců a vyšších rostlin hraje důležitou úlohu v organizaci a expresi genů metylace cytozinu. Metoda enzymového sekvencování však neumožňuje odlišit cytozin a **5-metylcytozin** (m^5C). Z tohoto důvodu byla vyvinuta selektivní chemická metoda využívající hydrogensířičitan sodný ($NaHSO_3$) k modifikaci cytozinu v DNA, označovaná jako **hydrogensířičitanové genomové sekvencování**. Podstatou této metody je chemická reakce, při níž dochází u denaturované DNA ke kompletní deaminaci cytozinu na uracil s následnou amplifikací obou řetězců pomocí PCR. Cytozinové báze přeměněné hydrogensířičitanem na uracil jsou v průběhu PCR nahrazeny tyminem a báze 5-metylcytozinu, které nebyly modifikovány, jsou nahrazeny cytozinem. Produkty PCR mohou být buď přímo sekvencovány nebo subklonovány a sekvencování jsou podrobeny jednotlivé klony. Získané sekvence jsou srovnány se sekvencemi stanovenými před chemickou modifikací. Ve výsledném vzoru hydrogensířičitanového sekvencování se původní cytozin jeví jako tymin, zatímco m^5C je zobrazen jako cytozin. Kvantitativní zastoupení metylcytozinů se stanovuje u přímého sekvencování produktů PCR z poměru ploch píků tyminu a cytozinu, výsledky však nejsou příliš spolehlivé. Proto se častěji sekvencuje reprezentativní počet jednotlivých klonů (20–50), a zastoupení metylcytozinů nalezených v určité poloze se vyjádří v procentech z celkového počtu sekvencovaných klonů.

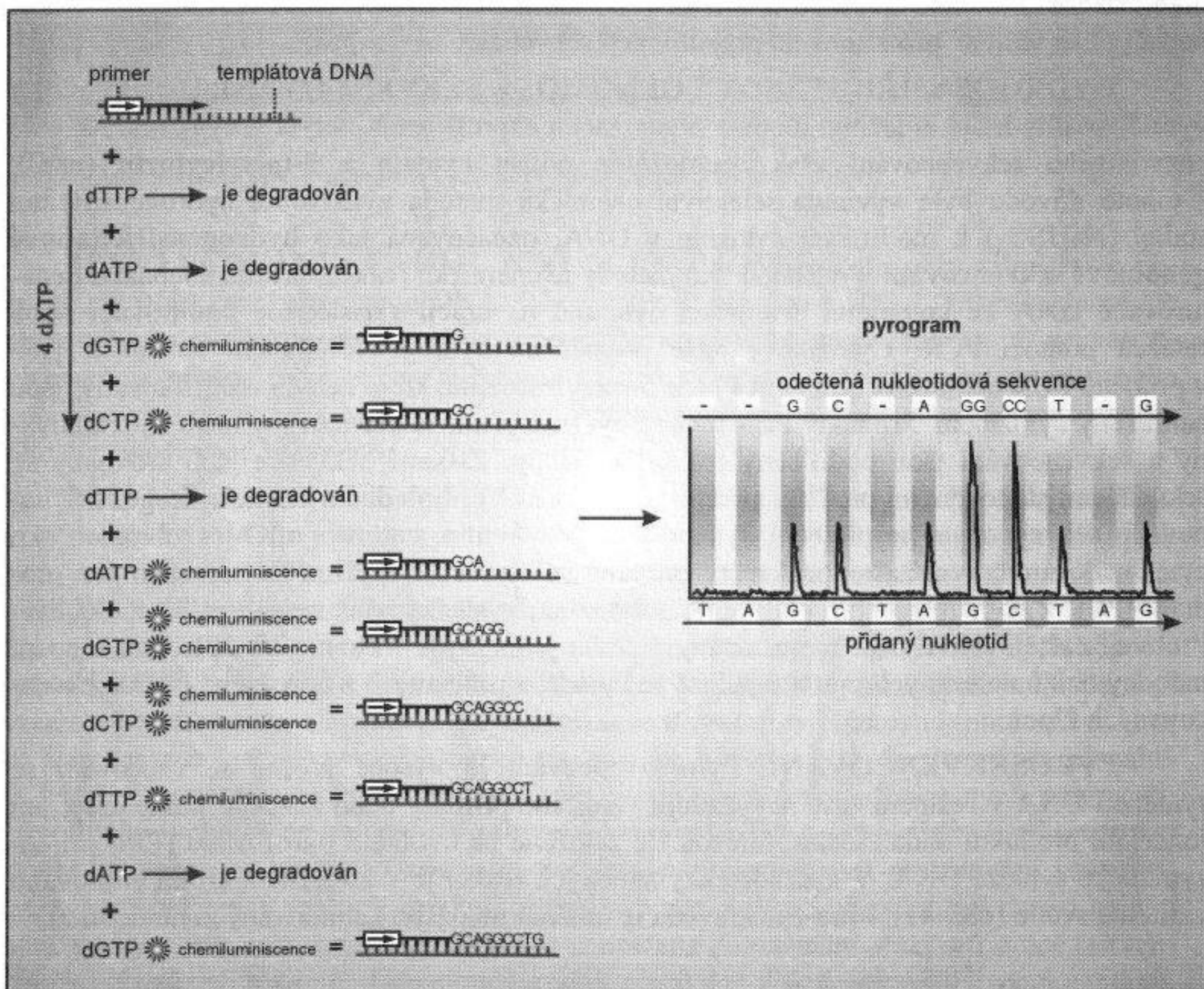
PYROSEKVENCOVÁNÍ. Pyrosekvencování je vysoce přesné sekvencování se syntézou DNA v reálném čase nevyžadující značené primery nebo značené nukleotidy, ani rozdělení produktů reakcí elektroforézou. Je založené na uvolnění pyrofosfátu (PPi) při enzymatické syntéze DNA. V kaskádě enzymatických reakcí je v konečném kroku emitováno viditelné světlo (obr. 41). Míra emise světla je úměrná množství zabudovaných nukleotidů.



Obr. 41 Přehled reakcí probíhajících při pyrosekvencování

V prvním kroku se hybridizuje sekvenační primer k jednořetězcovému templátu DNA a je inkubován s následujícími enzymy a substráty:

- DNA-polymerázou I z *E. coli*,
- ATP sulfurylázou,
- luciferázou,
- apyrázou,
- adenosin 5'-fosfosulfátem (APS),
- luciferinem.



Obr. 42 Princip pyrosequencování DNA

Ve druhém kroku (obr. 42) se postupně přidávají (jeden po druhém) všechny čtyři dNTP (v tomto případě se označují dXTP). Pokud se na matricové molekule vyskytuje komplementární báze k přidanému dXTP, DNA-polymeráza katalyzuje připojení nukleotidu k primeru. Pokud na matici není přítomna komplementární báze, nukleotid bude degradován apyrázou. Každé připojení nukleotidu je provázeno uvolněním pyrofosfátu (PPi) v ekvimolárním množství k zabudovanému nukleotidu. Uvolněné PPi jsou kvantitativně převáděny ATP sulfurylázou za přítomnosti APS na ATP, což umožňuje luciferázou zprostředkovanou konverzi luciferinu na oxyluciferin. Oxyluciferin vytvoří světelný záblesk, který lze zaznamenat detektorem fotonů a zobrazit jako vrchol na pyrogramu. Nepřipojené dXTP a nespoteřebované ATP jsou degradovány apyrázou. Jakmile je degradace volných nukleotidů

v reakční směsi dokončena, je přidán další dXTP. Celý proces se znovu opakuje a sekvence je odečítána z pyrogramu (obr. 42). Namísto standardního dATP je při reakci používán **2'-deoxyadenozin-5'- α -tio-trifosfát**, který je zpracován DNA-polymerázou, ale nikoli luciferázou. Rychlost pyrosekvencování je cca 1 odečtená báze/min a běžná délka stanovené sekvence je přibližně 100 bp. V současnosti jsou používány dvě rozdílné techniky pyrosekvencování: v roztoku a na pevné fázi využívající imobilizovanou DNA. Metoda je ve vývoji a je používána pro ověření sekvencí krátkých fragmentů DNA a identifikaci jednonukleotidových polymorfizmů v genomech. Zejména pyrosekvencování v roztoku umožňuje snadnou automatizaci a možnost paralelního zpracování velkého množství vzorků.

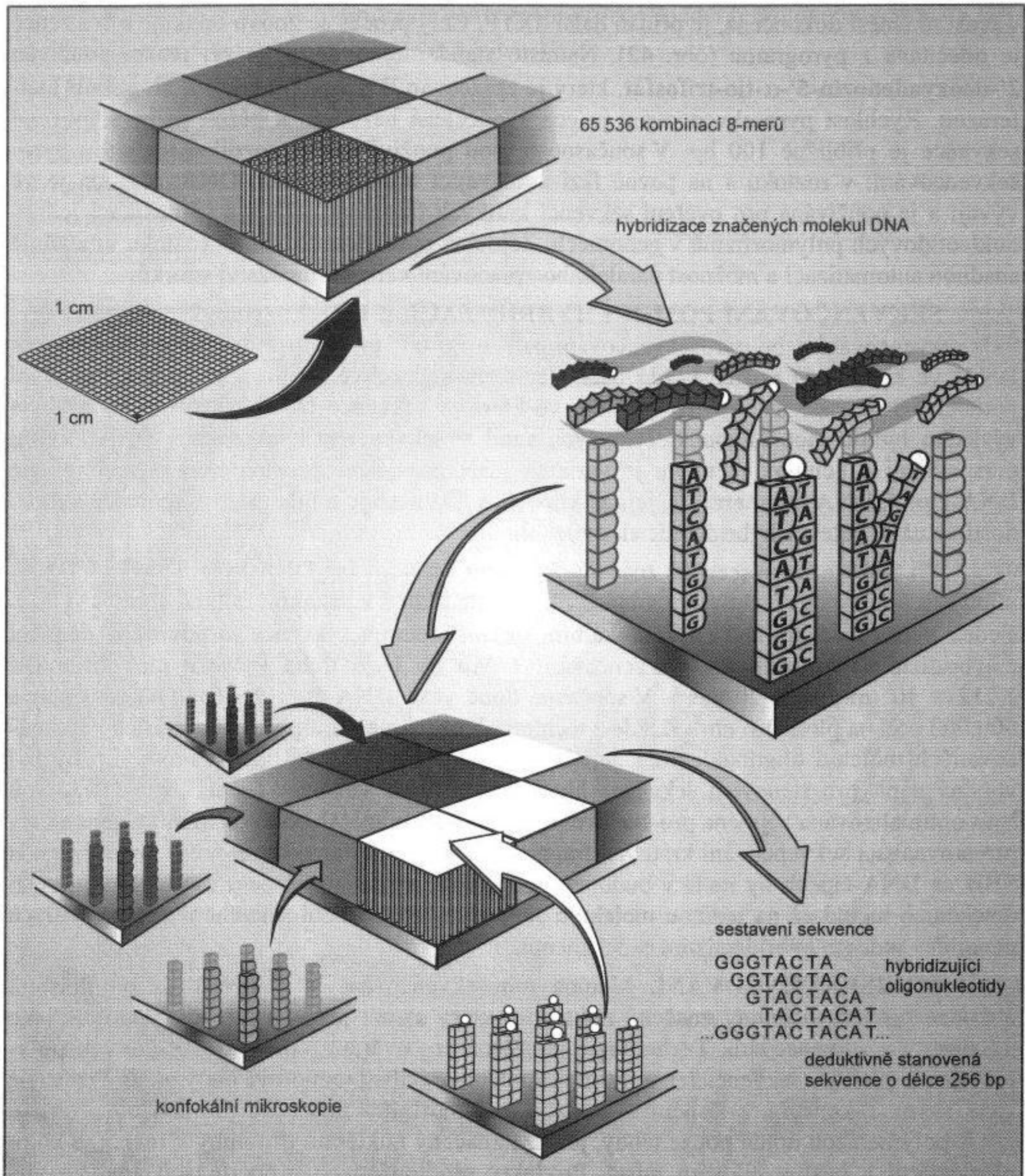
SEKVENCOVÁNÍ POMOCÍ HYBRIDIZACE (SBH). Enzymová a chemická metoda sekvencování nebo pyrosekvencování patří mezi tzv. přímé metody stanovení sekvence DNA, ve kterých je pozice každé báze stanovena jednotlivě. Naproti tomu sekvencování pomocí hybridizace je nepřímá metoda, ve které je sekvence DNA sestavena na základě výsledku hybridizace oligonukleotidových sond se sekvencemi analyzované DNA. Velmi perspektivní a účinnou metodou je varianta SBH prováděná prostřednictvím technologie **DNA-čipů** („DNA microarray“), jejímž klíčovým faktorem je miniaturizace společně s možností vizuální detekce hybridizujících molekul.

Při SBH je fluorescenčně značený fragment analyzované DNA hybridizován k DNA-čipu obsahujícímu všechny kombinace oligonukleotidů s konstantní délkou (obr. 43). Výsledek hybridizace je odečten konfokálním mikroskopem a sekvence je odvozena dedukcí z hybridizujících pozic. Pro sekvencování 1 Mb by bylo třeba vytvořit čip obsahující $1,112 \times 10^6$ možných 20-merů. V současné době však DNA-čipy dosahují hustoty pouze 500 000 polí na ploše $1,6 \text{ cm}^2$. Každé z těchto polí obsahuje milióny fotolitograficky syntetizovaných molekul oligonukleotidů, jejichž délka může být až 25 bází. Takový čip by byl vhodný např. pro stanovení sekvence klonované v BAC vektoru. Technologie DNA-čipů byla optimalizována zejména pro stanovení jednonukleotidových polymorfizmů v genomech, pro srovnávací sekvencování krátkých fragmentů DNA a pro analýzu exprese genů. Metoda SBH na DNA-čipech by měla v budoucnu po dosažení miniaturizace a zvýšením citlivosti detekčních metod až na jedinou molekulu sondy umožnit rutinní sekvenční analýzu celých genomů v jednom hybridizačním experimentu.

MINISEKVENCOVÁNÍ. Metoda minisekvencování je založená na prodloužení 3'-konce primeru o jediný značený nukleotid, který slouží jako terminátor, podobně jako u Sangerova sekvencování. Technologie je určena pro ověření **jednonukleotidových polymorfizmů** (SNP) v sekvencích a umožňuje spolehlivě odlišit jednotlivé alely genů. Primer se váže svým 3'-koncem v těsném sousedství polymorfního místa. K prodloužení primeru DNA-polymerázou dojde pouze tehdy, jestliže značený nukleotid přítomný v reakci je komplementární k bázi v cílovém místě. Produkty prodloužených primerů jsou analyzovány elektroforeticky a vyznačují se odlišnou pohyblivostí.

Automatizaci stanovení jednonukleotidových polymorfizmů umožňuje modifikace metody prováděná na DNA-čipech, která používá specificky fluorescenčně značené nukleotidy. Pro stanovení totožnosti báze existuje několik variant stanovení (APEX, AS-PE), které využívají prodloužení primeru o jeden nebo více nukleotidů před nebo po hybridizaci (obr. 44):

- Při prodloužení imobilizovaného primeru je specifický primer pro každý SNP, který genotypizujeme, vázaný na čipu. K čipu jsou přidány produkty mnohonásobné PCR, na 3'-konci fluorescenčně značené ddNTP a DNA-polymeráza. Po prodloužení primeru o jeden ddNTP je výsledek reakce vyhodnocen: pozice primeru na čipu definuje, který SNP analyzujeme a fluorescence nukleotidu při dané vlnové délce určuje genotyp příslušného SNP.

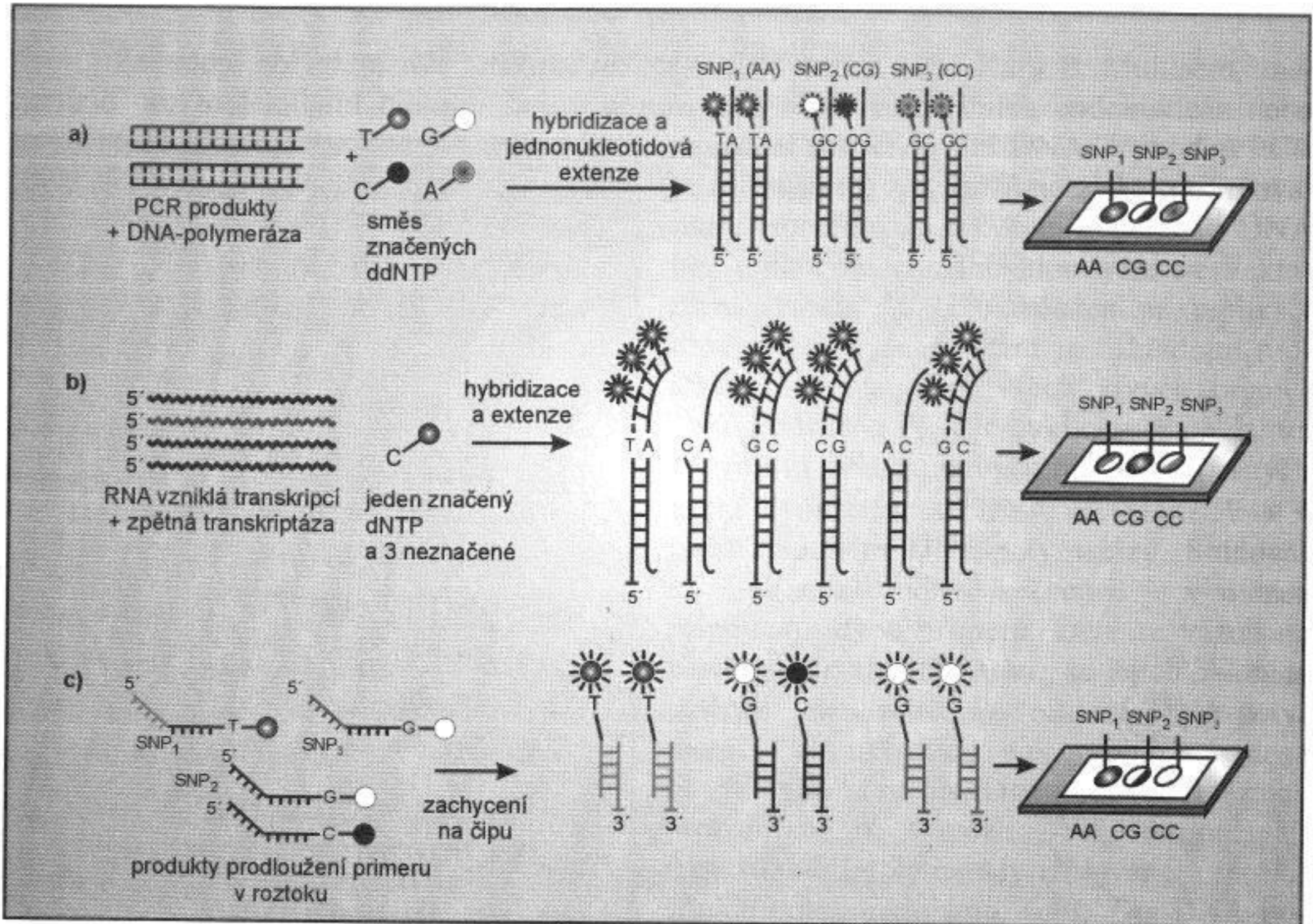


Obr. 43 Princip sekvenování pomocí hybridizace s použitím DNA-čipu

- Při alelově specifickém prodloužení primeru jsou na čipu imobilizovány dva alelově-specifické primery s 3'-koncovou bází komplementární k oběma možným variantám nukleotidů v každém SNP. Produkty mnohonásobné PCR jsou přepsány do mnoha kopií RNA RNA-polymerázou. Molekuly RNA hybridizují k čipu a slouží jako templát pro prodloužení primeru katalyzované zpětnou transkriptázou. Během zpětné transkripce jsou do produktů začleněny fluorescenčně značené dNTP. U homozygotních genotypů je signál tvořen pouze jedním ze dvou alelově-specifických prodloužených primerů, kdežto u heterozygotních genotypů je signál tvořen oběma prodlouženými primery.

STANOVENÍ SEKVENCE DNA (SEKVENCOVÁNÍ DNA)

- Cyklické prodloužení primerů nesoucích specifickou přídatnou sekvenci adaptoru na 5'-konci je prováděno s denaturovanou DNA v roztoku za přítomnosti fluorescenčně značených ddNTP a DNA-polymerázy. DNA-čip obsahující sondy komplementární k přídatným sekvencím adaptorů je potom použit pro zachycení produktů reakce, při které došlo k prodloužení primerů.

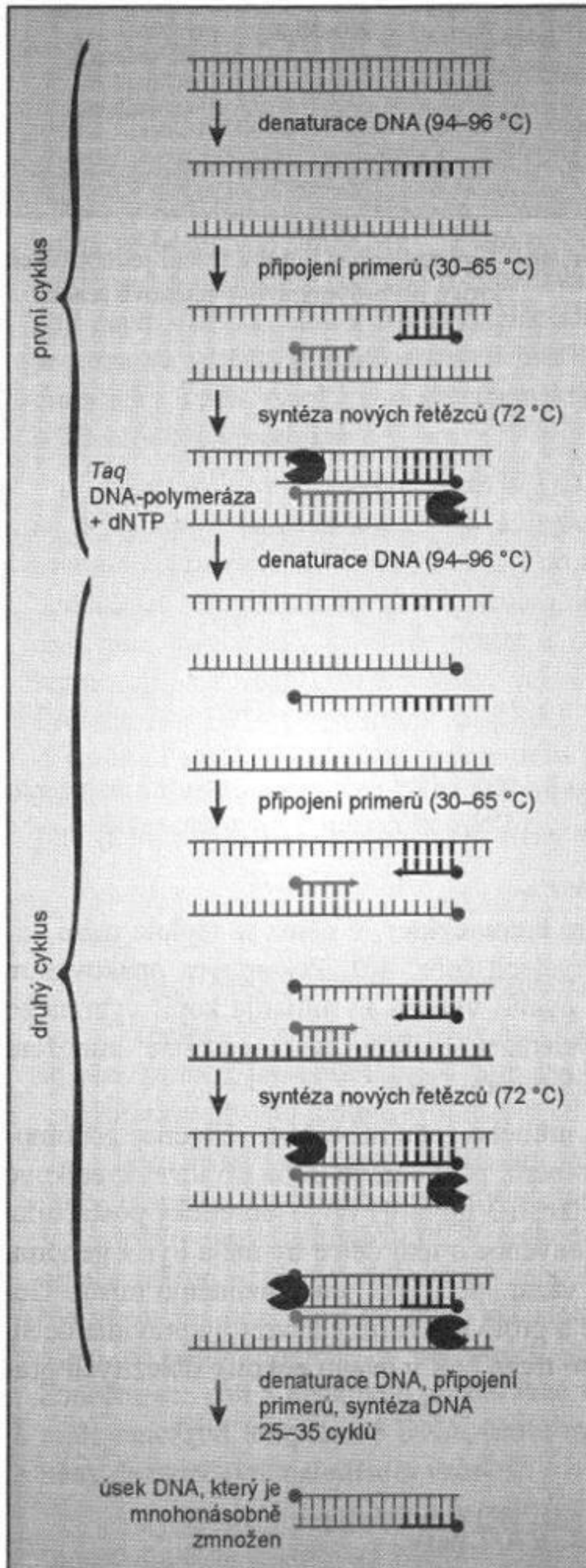


Obr. 44 Varianty minisekvencování prováděné na DNA-čipu

VI. Amplifikace nukleových kyselin

1. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Zavedení polymerázové řetězové reakce (PCR) v roce 1985 Kary B. Mullisem, znamenalo pro molekulární biologii stejný přínos jako objev restričních endonukleáz nebo

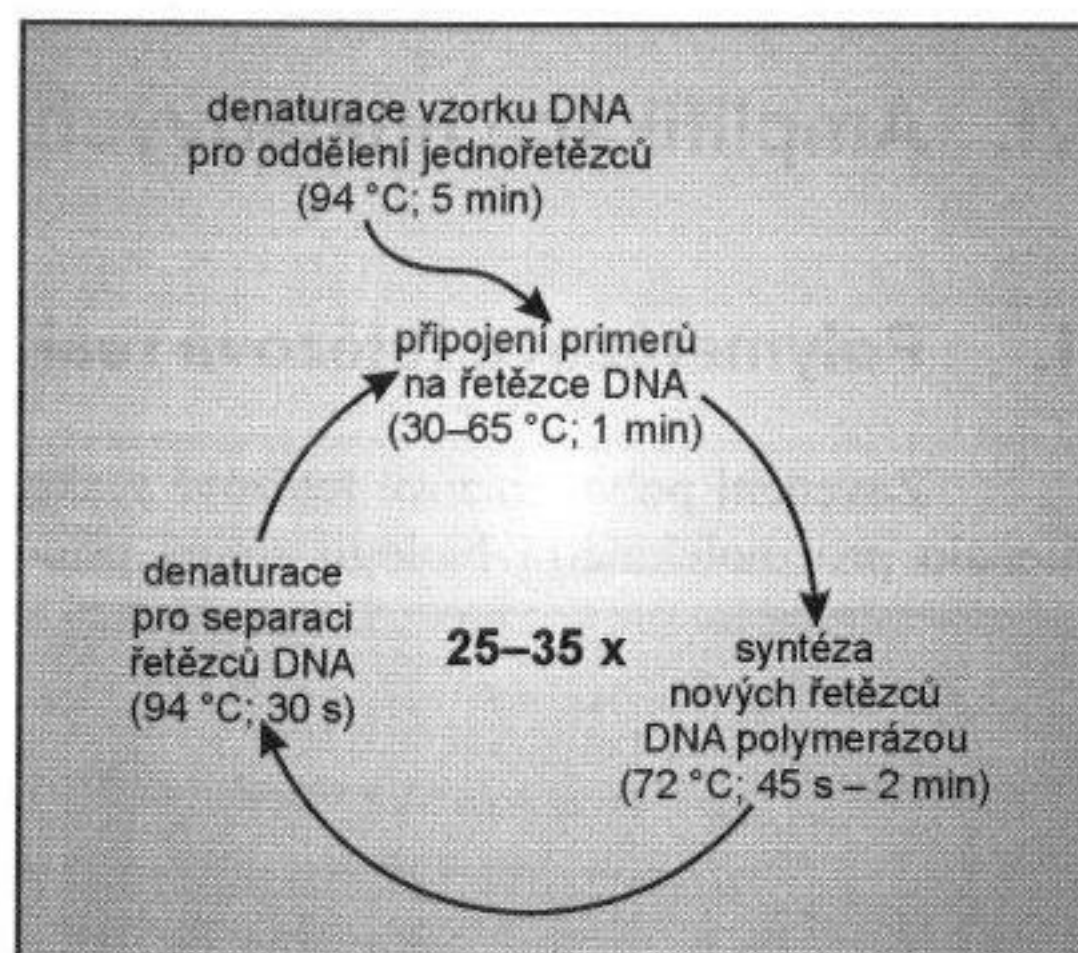


zavedení sekvencování DNA. Výhodou PCR je zejména to, že umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech. Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě. Po přidání DNA-polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. **Taq DNA-polymeráza** z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů. PCR je proces při němž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu (obr. 45):

- denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94 °C),
- připojení primerů k odděleným řetězcům DNA (30–65 °C),
- syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65–75 °C).

Obr. 45 Princip standardní polymerázové řetězové reakce (PCR)

Číslo cyklu	Počet syntetizovaných molekul produktu
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1024
13	2048
14	4096
15	8192
16	16384
17	32768
18	65536
19	131072
20	262144
21	524288
22	1048576
23	2097152
24	4194304
25	8388608
26	16777216
27	33554432
28	67108864
29	134217728
30	268435456
31	536870912
32	1073741824



Obr. 46 Teplotní režim a doby trvání jednotlivých kroků při polymerázové řetězové reakci

Tabulka 3 Teoretická amplifikace cílového fragmentu DNA při zvyšujícím se počtu cyklů

Reakce se provádějí v zařízení nazývaném **termocykler**, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech (obr. 46). Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně (2^n ; n = počet cyklů) vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly (Tabulka 3). Jelikož výsledkem PCR je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, lze ji označit za způsob klonování DNA.

Přesnost a úspěšnost PCR při amplifikaci určitého genu nebo části sekvence genomové DNA je závislá na pečlivém návrhu obou primerů, při němž je třeba přihlížet k celkové sekvenci studovaného genomu. Pro genom o velikosti 3 miliardy bp je teoreticky postačující sekvence primeru o délce 16 nukleotidů (4^{16}). Sekvence o této délce by měla být v genomu uvedené velikosti jedinečná a měla by se proto vázat specificky jen k jedinému místu. Genomy organismů však nemají náhodné sekvence a proto se primery navrhuje zpravidla delší. Při **návrhu primerů** pro standardní PCR je proto třeba brát v úvahu několik důležitých pravidel, mezi něž patří:

- délka zpravidla 18–25 nukleotidů,
- obsah G+C 40 % až 60 %,
- rovnoměrná distribuce oblastí bohatých na G/C a A/T páry,

- teplota T_m primeru alespoň 50 °C,
- podobná teplota T_m u obou primerů,
- specifčnost primerů – na matricové DNA nesmí být nesespecifická vazebná místa,
- absence komplementárních sekvencí v primerech, které by mohly vést k tvorbě duplexů,
- absence vnitřních sekundárních struktur (vlásenek),
- zařazení 1 až 2 zbytků G nebo C v sekvenci na 3'-koncích primerů pro zajištění přesné vazby na templát.

Komerčně dostupné syntetizátory oligonukleotidů poskytují dostatečnou čistotu (> 98 %) a primery běžných velikostí mohou být používány při PCR bez přečištění. Pro návrh primerů v analyzovaných oblastech sekvence DNA existuje řada počítačových programů, které umožňují zohlednit výše zmíněná pravidla.

Přesné hodnoty teploty a dobu trvání jednotlivých kroků je třeba optimalizovat. Pro získání požadovaného produktu, specifčnosti a výtěžku je důležitá koncentrace jednotlivých složek reakční směsi. Kromě *Taq* DNA-polymerázy a primerů obsahuje reakční směs jako kofaktor hořčičnaté ionty Mg^{2+} , které tvoří rozpustný komplex s jednotlivými 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty (dNTP) rozpoznávaný DNA-polymerázou. Jelikož ionty Mg^{2+} interagují nejen s dNTP, ale i s primery, templátovou DNA, EDTA a dalšími chelatačními činidly, je třeba ve většině případů stanovit pro každou aplikaci optimální koncentraci iontů Mg^{2+} empiricky. Příliš vysoká koncentrace některé ze složek reakce může vést k chybám a vzniku nesespecifických produktů.

Optimální počet cyklů je závislý na výchozí koncentraci templátové DNA a zpravidla se pohybuje v rozmezí od 25 do 35 cyklů. Příliš vysoký počet cyklů významně zvyšuje množství vznikajících nesespecifických produktů PCR. Pro PCR je důležitá úplná počáteční denaturace templátu a obvykle k tomuto účelu postačuje zahřátí směsi na 94–97 °C po dobu 2–5 min. V případě, že dojde pouze k částečné denaturaci, molekuly DNA velice rychle renaturují, což vede k nesespecifické vazbě primerů („self-priming“) a falešným výsledkům. Protože *Taq* DNA-polymeráza má při 95 °C poločas stability 40 min, volí se pro následnou denaturaci ampliconů během reakce doba pouze 15–45 s. Podmínky pro hybridizaci primerů závisí na zastoupení bází, délce oligonukleotidů a hodnotě T_m produktu. **Teplota pro připojení (hybridizaci) primerů (T_a)** se stanovuje podle vztahu:

$$T_a = 0,3 \times T_m^{\text{Primer}} + 0,7 \times T_m^{\text{Produkt}} - 25,$$

avšak obecně užívaným pravidlem pro stanovení T_a je snížení teploty T_m o 5 °C.

Teplota T_a se obvykle pohybuje v rozmezí 55 až 68 °C po dobu 30–60 s, doporučuje se však provést její optimalizaci. Syntéza DNA probíhá zpravidla při 68–72 °C. *Taq* DNA-polymeráza při této teplotě syntetizuje DNA rychlostí cca 60 bází/s.

Pro PCR jsou často používány jako zdroj DNA různé biologické materiály, např. hrubé extrakty z krve, tělní tekutiny, kultury mikroorganismů, buňky z tkáňových kultur, atd. V důsledku vysoké citlivosti PCR je vhodné provést hrubou extrakci vzorků za použití kombinace zahřátí a různých detergentů nebo enzymatického štěpení. U těchto materiálů by měla být věnována pozornost možným nečistotám, které mohou inhibovat *Taq* DNA-polymerázu. Mezi ně patří komponenty červených krvinek, některé detergenty (SDS), EDTA, vysoké koncentrace solí a negativně působí také vysoká koncentrace DNA. Pro PCR je třeba pouze malé množství templátové DNA, proto mohou být tyto nečistoty ve většině případů odstraněny dostatečným naředěním vzorku.

Výsledným produktem PCR jsou **amplikony** – úseky DNA definované délkou o velikosti obvykle desítky až tisíce bp, analogické restričními fragmentům, jejichž přítomnost

se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase (str. 79). Podrobná analýza polymorfizmů sekvencí v produktech PCR může být dále provedena některou z následujících metod:

- elektroforetickou separací produktů za specifických podmínek pro detekci sekvenčních polymorfizmů denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE, str. 16),
- analýzou polymorfizmů konformace jednořetězcových forem (SSCP, str. 57),
- hybridizací s neradioaktivně značenou sondou komplementární k části sekvence amplifikovaného úseku a detekcí enzymoimunoanalýzou v mikrotitrační destičce (PCR-EIA/ELISA); hybridizační sonda může být následně amplifikována (PCR-OLA, str. 108),
- imobilizací PCR-produktů na membráně a tečkovou hybridizací se značenými **alelově-specifickými oligonukleotidy** (ASO) nebo zpětnou tečkovou hybridizací s různými ASO imobilizovanými na membráně,
- hybridizací na DNA-čipech, str. 69,
- stanovením sekvence DNA, str. 59.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ PCR. PCR je plně automatizovaný proces, který využívá termostabilní DNA-polymerázu. Avšak i termostabilní DNA-polymeráza katalyzuje prodlužování primeru při laboratorní teplotě, což může být příčinou chyb a vzniku nespecifických produktů, zejména při nízkých koncentracích templátové DNA. Specifičnost, citlivost a výtěžek reakce významně ovlivňuje modifikace PCR označovaná „**hot-start**“ PCR. Při PCR s horkým startem jsou určité složky reakční směsi (viz níže) odděleny od ostatních, dokud teplota ve zkumavce nepřekročí optimální teplotu pro připojení primeru (obvykle 55 až 65 °C). DNA-polymeráza je v této nekompletní reakční směsi nefunkční a proto nedochází k prodlužování nespecificky navázaných primerů dokud není dosažena teplota T_a . Separace důležitých složek reakční směsi je dosaženo některým z následujících způsobů:

- Některé složky reakce jako DNA-polymeráza nebo ionty Mg^{2+} jsou v původní reakční směsi vynechány a přidány manuálně po dosažení teploty > 70 °C. Nevýhodou je možnost kontaminace a možná ztráta reprodukovatelnosti.
- Reakční komponenty jsou rozděleny do dvou směsí, které jsou odděleny fyzikální bariérou (vosková přepážka, nebo voskové korálky obsahující $MgCl_2$). Během počáteční denaturace vosk roztaje a umožní smíchání složek reakce.
- Přídavek teplotně nestabilních protilátek specifických pro DNA-polymerázu umožní její počáteční inaktivaci.
- Chemická modifikace polymerázy teplotně nestabilními látkami, které se vážou na určité aminokyselinové zbytky, způsobí inaktivaci enzymu při laboratorní teplotě. K aktivaci enzymu dochází při počáteční denaturaci DNA.

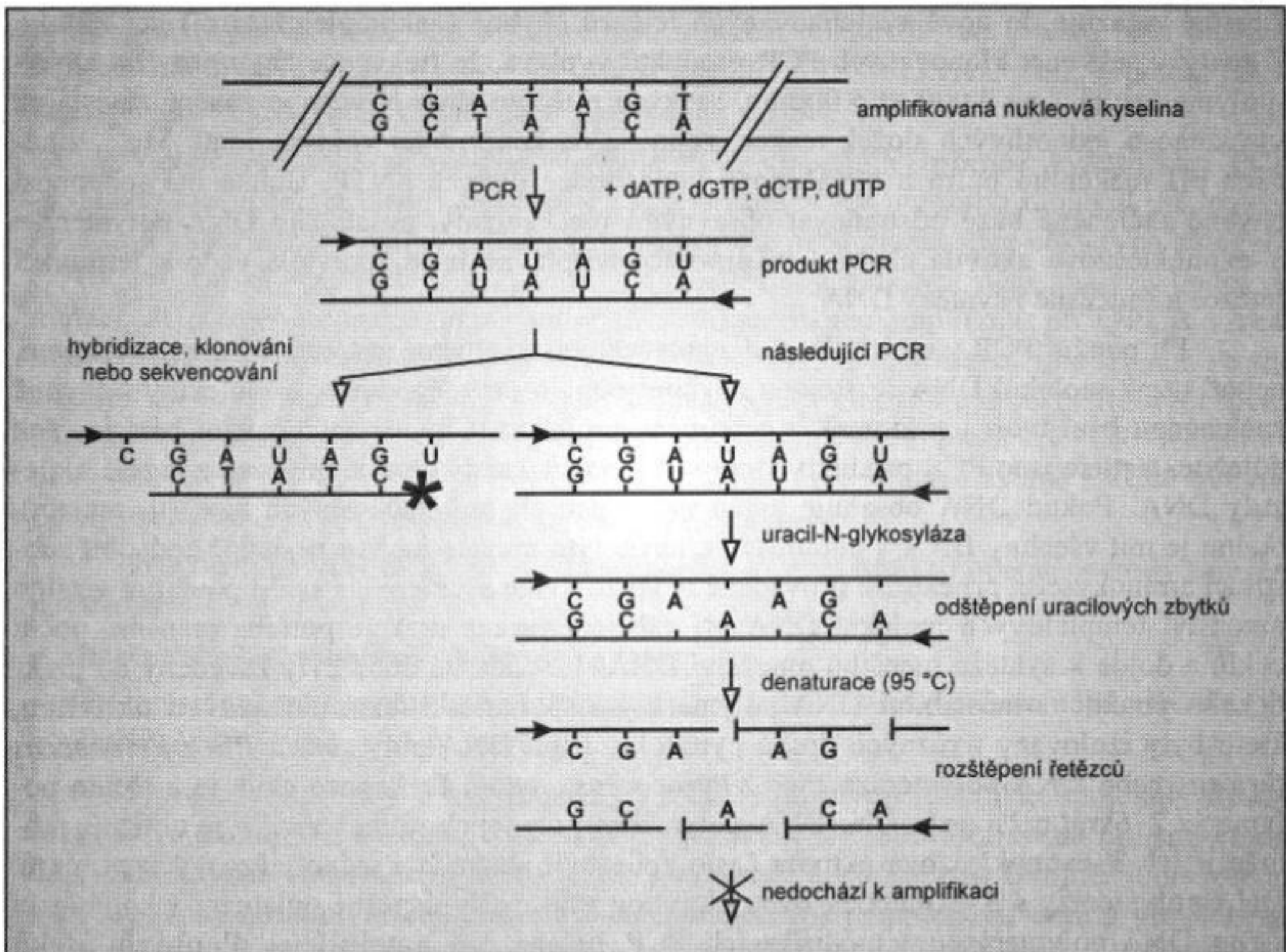
Vysoká citlivost a specifita PCR způsobuje, že **kontaminace** i jedinou molekulou exogenní nebo neznámé DNA postačuje pro získání falešného signálu. Pro minimalizaci falešných pozitivních výsledků byly doporučeny určité standardní postupy zahrnující používání autoklávovaných roztoků, fyzikální separaci používaných PCR-reagencií od templátové DNA a produktů PCR, přípravu reagencií i vzorků do alikvotních částí, používání UV-světla k odstranění exogenních nukleových kyselin na pracovní ploše, používání jednorázových rukavic, přidávání DNA do reakce jako poslední složky a pečlivou volbu pozitivních, negativních a vnitřních kontrol. Vyloučení kontaminace je důležité zejména u nízkokopiových templátů DNA nebo degradovaných vzorků, kde je potřeba použít vysokého počtu amplifikačních cyklů, aby bylo dosaženo požadovaného množství produktu. V těchto případech může zbytkové množství exogenní DNA konkurovat templátové DNA, potlačit amplifikační

AMPLIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

proces a způsobit tak falešný výsledek. V případě pochybností je nejlepším přístupem opakování experimentu s pečlivým dodržováním dílčích postupů a kontrol. Jako zdroj kontaminace DNA je nejčastěji uváděn:

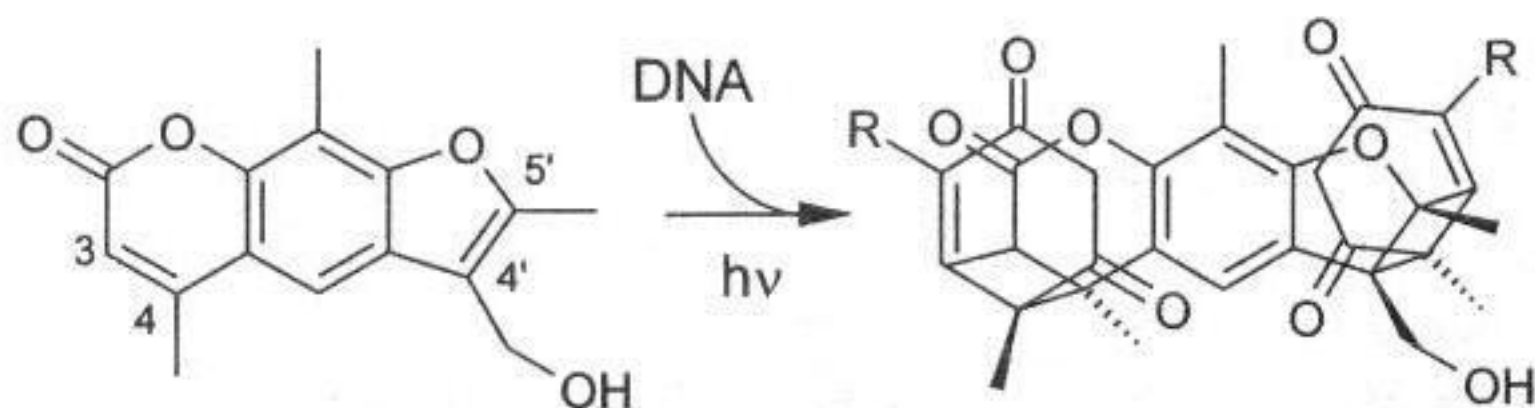
- přenos kontaminující DNA z dříve amplifikovaných produktů PCR,
- vzájemná kontaminace zdrojových materiálů,
- kontaminace vektorem z rekombinantního klonu, který obsahuje cílovou sekvenci.

Z těchto tří příčin kontaminace jsou nejvýznamnější přenesené sekvence dříve získaných amplikonů, protože jsou z cílových sekvencí přítomny v laboratoři v relativně největším množství. K prevenci amplifikace kontaminující DNA je v reakční směsi rutinně používán **2'-deoxyuridin-5'-trifosfát (dUTP)** namísto 2'-deoxytymidin-5'-trifosfátu (dTTP). Následným působením **uracil-N-glykosylázy** na reakční směs před zahájením amplifikace dojde k odstranění dU z každého možného produktu PCR způsobujícího kontaminaci, přičemž templátová DNA a dUTP zůstanou neovlivněny. Odstraněním dU dojde k vytvoření míst bez bází, která jsou teplotně labilní a řetězce jsou během počáteční denaturace degradovány (obr. 47).



Obr. 47 Využití uracil-N-glykosylázy při ochraně před kontaminací při polymerázové řetězové reakci

Alternativně lze amplifikační produkty PCR inaktivovat fotochemicky deriváty **psoralenu** nebo **isopsoralenu**, což jsou furokumarinové sloučeniny interkalující se mezi páry bází DNA. Pokud jsou tyto látky excitovány UV-světlem o vlnové délce 320–400 nm, kovalentně se vážou na nukleové kyseliny a tvoří s pyrimidinovými bázemi cyklobutanové adukty, které blokuji reakci s DNA-polymerázou (obr. 48).



Obr. 48 Tvorba cyklobutanových aduktů s pyrimidinovými bázemi po excitaci UV-světlem

Inaktivační látky se přidávají do reakce před zahájením amplifikace. Po proběhnutí PCR, ještě před otevřením zkumavky a vystavením amplikonu atmosféře, je provedeno ozáření a aktivace fotochemicky reaktivní látky. Účinnost fotochemické inaktivace však nemusí být stoprocentní a závisí na koncentraci inaktivačního činidla, obsahu G+C v produktu a přítomnosti různých inhibitorů v reakční směsi.

BEZCHYBNOST SYNTÉZY A OMEZENÍ DÉLKY PRODUKTU. Podobně jako jiné biochemické procesy ani replikace neprobíhá bezchybně a *Taq* DNA-polymeráza příležitostně zařazuje do nově syntetizovaných řetězců chybné (nekomplementární) nukleotidy. Z analýzy sekvencí klonovaných PCR produktů vyplývá, že frekvence chyb pro *Taq* DNA-polymerázu je 1 na 4 000 až 5 000 bp. Frekvence těchto chyb *in vitro* je značně závislá na vyváženosti jednotlivých složek reakce, zejména na koncentraci volných iontů Mg^{2+} , změnách pH reakčního pufru a vyváženosti koncentrace čtyřech dNTP. Buňka má schopnost chybně začleněné báze odstraňovat opravnými mechanismy, avšak *Taq* DNA-polymeráze 3'-exonukleázová aktivita chybí a inkorporace nesprávné báze zpravidla vede k terminaci řetězce a současně i syntézy DNA.

Při použití PCR v molekulární diagnostice nejsou chybně začleněné báze problémem, neboť vznik molekul DNA se stejnou chybou je málo pravděpodobný a molekuly s chybně začleněnou bází tvoří jen zlomek z celkového produktu. Chybné začleňování bází je však důležité, jestliže jsou PCR produkty klonovány, neboť každý klon je odvozen z jediné molekuly DNA. Pokud DNA obsahuje jednu nebo více chybně začleněných bází (tj. mutací), budou je mít všechny DNA v potomstvu a navíc tyto mutace mohou následně způsobit substituci aminokyselin při expresi prováděné *in vitro*. Tento problém lze snížit použitím většího množství templátových molekul DNA při zahájení reakce. Pak je potřeba menšího počtu cyklů a dojde k syntéze menšího množství DNA. V současné době byly zavedeny do praktického použití termostabilní DNA-polymerázy disponující 3'-exonukleázovou aktivitou, které byly izolovány z různých druhů pyrokoků, např. DNA-polymeráza *Pfu* z *Pyrococcus furiosus* nebo DNA-polymeráza *Pwo* z *Pyrococcus woesei*. Frekvence chyb je u těchto polymeráz 2–6krát nižší než u *Taq* DNA-polymerázy, ale jejich rutinní použití je obtížné, protože jejich 3'-exonukleázová aktivita často způsobuje degradaci jednořetězcových primerů. DNA-polymerázy s 3'-exonukleázovou aktivitou však našly úspěšné uplatnění v kombinaci s *Taq* DNA-polymerázou v modifikacích PCR určené pro **amplifikaci dlouhých úseků DNA**.

Při standardních podmínkách PCR bývají obvykle amplifikovány cílové úseky o velikosti do 3–4 kb. Lze získat rovněž amplikony delší než 5 kb, ale s nižším molárním množstvím. Toto omezení délky produktů PCR je důsledkem chybně začleněných nukleotidů, které značně snižují efektivitu amplifikace dlouhých úseků. Průlom v syntéze dlouhých úseků přineslo použití kombinace dvou termostabilních DNA-polymeráz, z nichž jedna má 3'-exonukleázovou aktivitu. Princip reakce je takový, že *Taq* DNA-polymeráza zajišťuje syntézu části produktu PCR v těsném napojení na opravňující 3'-exonukleázovou aktivitu

druhé DNA-polymerázy. Jakmile je chybně začleněný nukleotid opraven, *Taq* DNA-polymeráza dokončí syntézu dlouhého PCR-produktu. Z empirických studií vyplývá, že k tomuto účelu stačí pouze stopové množství DNA-polymerázy s 3'-exonukleázovou aktivitou, např. pro syntézu úseků delších než 20 kb lze použít přibližně 1 % DNA-polymerázy *Pwo* z celkového množství *Taq* DNA-polymerázy. Namísto *Taq* DNA-polymerázy je pro tento účel také doporučována jiná DNA-polymeráza označená *Tth* izolovaná z *Thermus thermophilus*. Důležitým faktorem při syntéze dlouhých úseků je izolace kvalitního templátu a jeho ochrana proti degradaci během střídání teplot při PCR. K tomuto účelu a také pro redukci nespecifické vazby primeru na templát mohou být použity přídatné látky, jejichž vliv se obvykle určuje experimentálně. Mezi tyto látky patří dimetylsulfoxid (DMSO), betain, glycerol, spermidin nebo protein 32 fága T4.

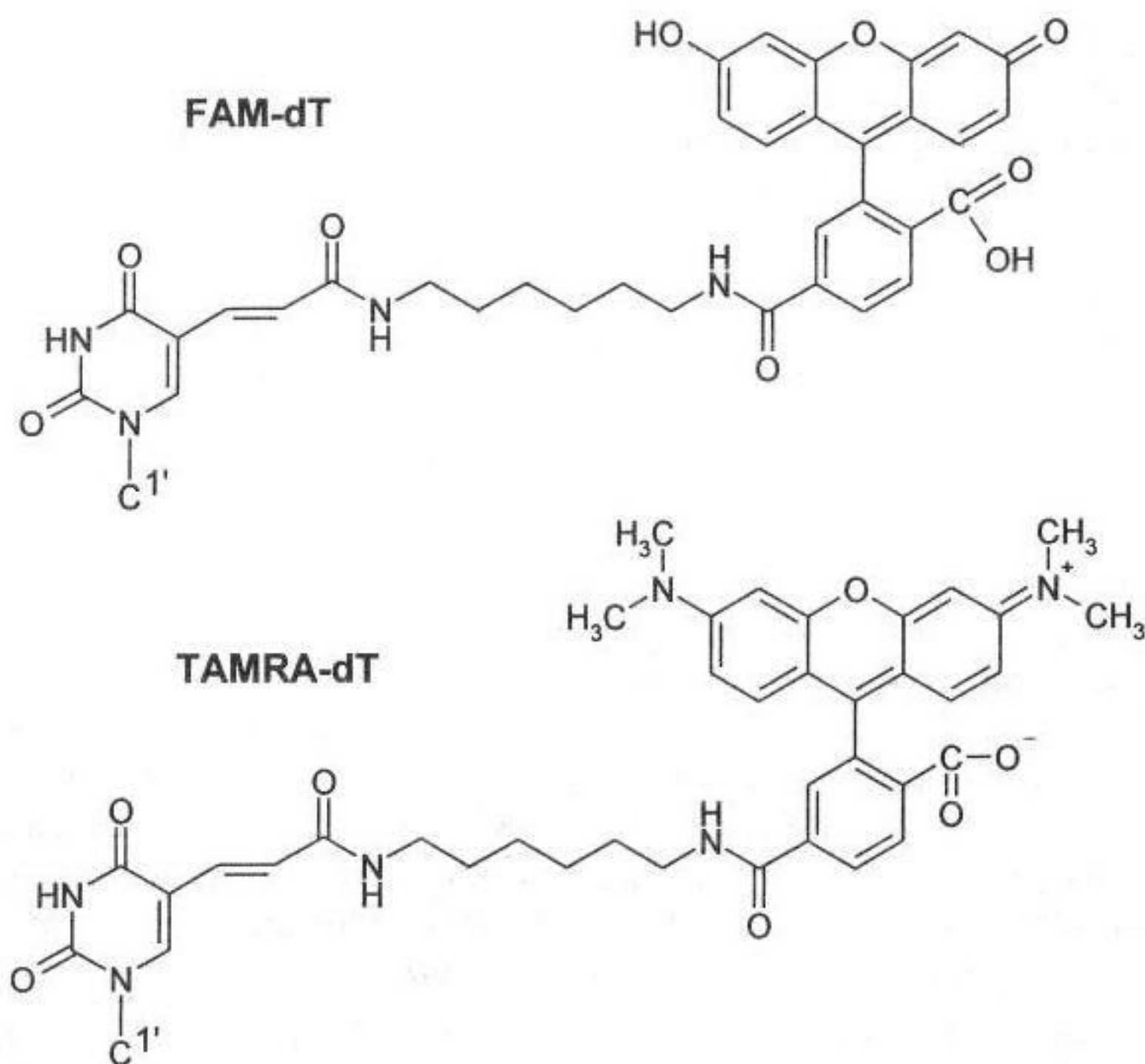
KVANTITATIVNÍ PCR (QPCR). Skutečnost, že při PCR dochází k exponenciální amplifikaci cílové sekvence nukleové kyseliny by mohla naznačovat, že se PCR nemůže stát kvantitativní metodou. Avšak již dříve byly popsány metody kvantifikace DNA pomocí mnohonásobné PCR (str. 85) s **kvantitativně kompetitivním stanovením (QC-PCR)**. Při tomto postupu jsou amplifikována známá množství kompetitivního templátu spolu se stejnými množstvími cílové DNA. Kompetitivní templát obsahuje stejné sekvence pro vazbu primerů jako cílová DNA, ale má rozdílnou velikost. Okamžik, ve kterém jsou intenzity PCR-produktů odvozených z cílové DNA a kompetitivní DNA ekvivalentní, je potom použit ke stanovení množství cílové sekvence v původním vzorku.

V současné době se používá varianta PCR umožňující přímou kvantifikaci PCR-produktu v průběhu reakce („real-time PCR“). Kvantifikace množství molekul nukleových kyselin je důležitá při detailním studiu genové exprese nebo diagnostice některých patogenů. QPCR má široké využití také v klinické diagnostice pro genotypizační analýzu bodových mutací, delecí nebo chromozomových aberací. Kvantifikace amplikonu při **QPCR v reálném čase** se provádí prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu ve speciálním zařízení, které kromě cyklického střídání teplot umožňuje detekci **fluorescence** a monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat produkty PCR elektroforeticky (viz též str. 124). Při provádění QPCR v reálném čase je nutné kromě faktorů ovlivňujících standardní PCR optimalizovat také kinetiku reakce.

Pro kvantitativní detekci produktu v průběhu PCR existují tři obecné metody založené na použití:

- interkalačního barviva vázajícího se na DNA,
- fluorescenčně značených sond vázajících se na střední část amplifikovaného produktu,
- fluorescenčně značených primerů.

Pro značení primerů a hybridizačních sond se používají specifické molekuly **fluoroforů**, které emitují světlo určité vlnové délky po předchozí absorpci světla odlišné vlnové délky. Emitovaná vlnová délka světla je vždy vyšší než absorbovaná. Dvojitě fluorescenčně značené sondy obsahují kromě fluoroforu také **zhášeč**, což je molekula, která přijímá energii z fluoroforu ve formě světla a způsobuje její rozptýlení buď ve formě světla s vyšší vlnovou délkou nebo tepla. K dosažení optimálního zhášení je třeba, aby se absorpční spektrum zhášeče překrývalo s emisním spektrem fluoroforu. V současné době existuje mnoho fluoroforů určených pro jednobarevné nebo vícebarevné mnohonásobné detekce polymorfních sekvencí (obr. 49).

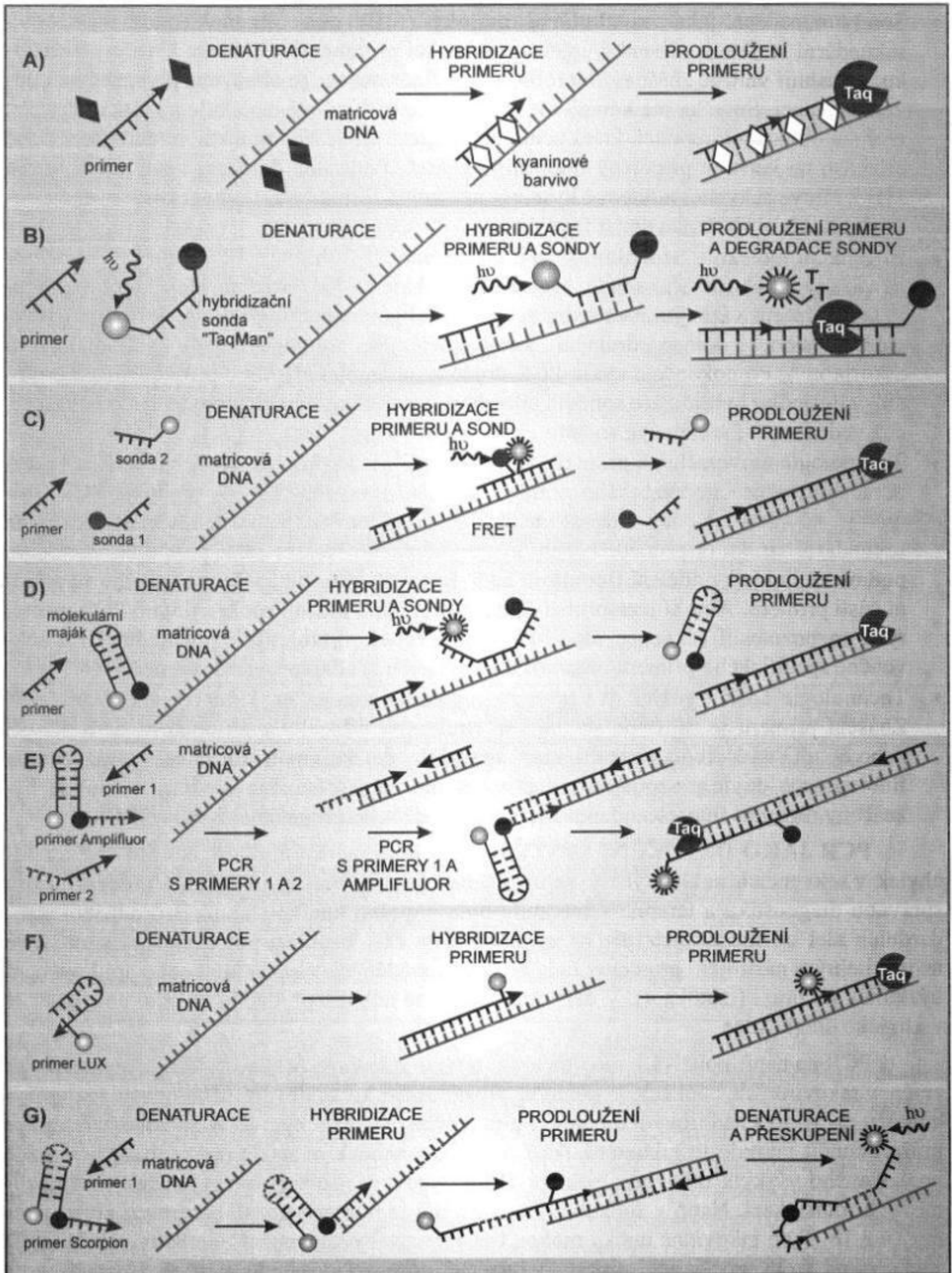


Obr. 49 Jedna z nejčastěji používaných dvojic fluoroforů při metodách FRET, donorový fluorofor FAM (6-karboxyfluorescein) a akceptorový fluorofor TAMRA (5-karboxytetrametylrodamin)

Detekce produktů QPCR se může provádět celou řadou technologií (obr. 50).

- Pro kvantifikaci amplikonů se běžně používají fluorescenční kyaninová barviva **SYBR[®] Green**, která fluoreskují po vazbě na menší žlábek dsDNA. Fluorescence SYBR green I je po vazbě na DNA až 1 000× vyšší a fluorescenční signál se zvyšuje se vzrůstajícím množstvím PCR-produktu. Signál se měří na konci elongace nebo kontinuálně. Je zřejmé, že barviva, která se vážou na DNA nemohou být použita u mnohonásobných reakcí a jejich hlavním omezením je nemožnost odlišení nespecifických produktů. Nespecifické signály tvořené dimery primerů mohou být zhašeny při použití primerů značených specifickými fluorofory.
- Sondy **TaqMan[™]** jsou oligonukleotidy delší než primery s hodnotou T_m vyšší asi o 10 °C s fluorescenční značkou na 5'-konci a zhášedčem na 3'-konci. Sonda se váže na vnitřní část amplifikované sekvence a pokud vytváří homoduplex, je rozložena 5' exonukleázovou aktivitou *Taq* DNA-polymerázy. To způsobí ukončení zhášení a emisi fluorescence.
- Dvojice fluorescenčně značených sond využívající **přenos energie fluorescenční rezonancí (FRET)**, což je excitovaný stav interakce dvou fluoroforů závislý na vzdálenosti, ve kterém je emise energie z donorového fluoroforu na 3'-konci první sondy spojená s excitací akceptorového fluoroforu na 5'-konci druhé sondy vázající se na sousedící sekvenci. Přenos energie mezi ligandy se může uskutečnit na vzdálenost 10–100 Å (1–5 nukleotidů), přičemž citlivost FRET může detekovat změny vzdáleností 1–2 Å na základě změny intenzity fluorescence.

AMPLIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN



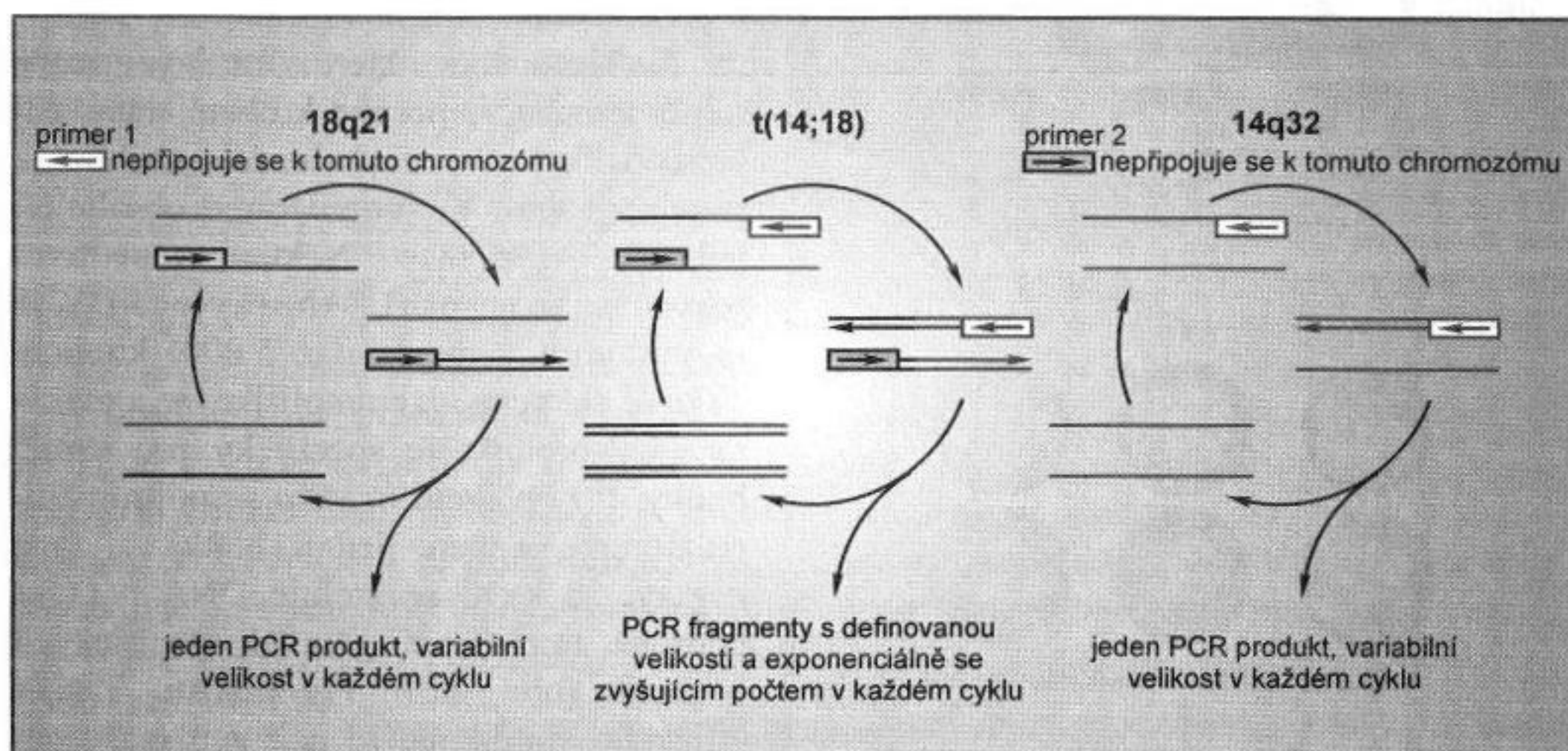
Obr. 50 Technologie používané pro detekci produktů při kvantitativní PCR. A) Fluorescenční barvivo vázající se na DNA. B) Technologie TaqMan. C) FRET mezi fluorofory nesenými dvěma sondami. D) Molekulární majáky. E) Technologie primerů AmpliFluor. F) Technologie primerů LUX. G) Bifunkční molekuly Scorpion

- Sondy označené jako **molekulární majáky (MB)** jsou oligonukleotidy vytvářející sekundární strukturu vlásenky určené pro detekci přítomnosti nukleové kyseliny v roztoku. Obsahují vnitřně zhášený fluorofor, jehož fluorescence je obnovena po vazbě na cílovou sekvenci. Smyčka má komplementární sekvenci k cílové molekule a krátká vlásenka tvořená obrácenou repeticí, která není homologická s cílovou molekulou, udržuje v těsné blízkosti na koncích připojený fluorofor a zhášec. Podstatou detekce je stabilnější vazba MB k cílové sekvenci nukleové kyseliny než volná forma MB. Po hybridizaci sondy dojde k ukončení zhášení a emisi fluorescence.
- Bi-funkční molekuly **Scorpions®** jsou oligonukleotidy obsahující PCR-primer kovalentně vázaný k hybridizační sondě. Molekula obsahuje na 5'-konci fluorofor, který interaguje se zhášecem vázaným na střední část téhož oligonukleotidu (monomolekulární „škorpión“) nebo 3'-konec druhého komplementárního oligonukleotidu (bimolekulární „škorpión“). Po dokončení cyklu PCR dojde k intramolekulárnímu přeskupení „škorpiónu“ v důsledku hybridizace sondy k cílové sekvenci. Fluorofor je tím oddělen od zhášeče, což vede k emisi světelného signálu.
- Technologie univerzálních primerů **AmpliFluor™** je detekční systém založený na inkorporaci fluorescenčně značeného primeru s vlásenkovou smyčkou do produktu PCR. Primer je navržen tak, aby fluorescenční signál byl tvořen pouze tehdy, je-li porušena sekundární struktura primeru během syntézy druhého řetězce PCR-produktu. Za těchto podmínek dojde k oddělení fluoroforu na 5'-konci primeru od zhášeče vázaného ve střední části primeru. AmpliFluor-primery jsou univerzální, pracují spolu s jinými PCR primery a rozpoznávají sekvence modifikovaných konců vytvořených prostřednictvím sekvencně specifického primeru obsahujícího dodatečnou adaptorovou sekvenci.
- Technologie **LUX** využívá dva primery, z nichž pouze jeden je fluorescenčně značený. Zhášení primeru je zajištěno sekundární strukturou vlásenky a přítomností páru dG-dC nebo dC-dG na 3'-konci primeru, který specificky detekuje polymorfni sekvenci. K emisi fluorescence dojde po prodloužení primeru. Primery se snadno navrhují a mohou být značeny různými fluorescenčními značkami umožňujícími mnohonásobné QPCR.

PCR JAKO DETEKČNÍ SYSTÉM. PCR je významným nástrojem pro detekci odchylek v sekvencích nukleových kyselin. Znalost povahy mutací je důležitá především pro správnou diagnostiku a terapii. V literatuře bylo popsáno mnoho technik pro odlišení standardních alel od mutantních, ale to je pouze malá část širokého potenciálu PCR. PCR je neocenitelným nástrojem pro celou řadu analýz prováděných v základním nebo aplikovaném výzkumu a v praxi (tabulka 4). V další části uvádíme několik příkladů širokého použití PCR v klinické diagnostice.

PCR se např. používá k monitorování terapie rakoviny. Možnost detekce genetických změn v rakovinných buňkách je cenným prostředkem ke sledování přítomnosti maligních buněk u pacientů s nádorovým onemocněním. Léčba cytostatickým léčivem nebo zářením se může ukončit jakmile je rakovinná tkáň zničena, a naopak se může opět zahájit v případě opakovaného výskytu rakoviny. Některé formy rakoviny vznikají jako výsledek chromozomových translokací. Např. u folikulárního lymfomu je popsána translokace mezi chromozomy 14 a 18. Tyto rakovinné buňky mohou být detekovány konvenční Southernovou hybridizací, pokud frekvence jejich výskytu v buněčné populaci dosahuje alespoň 1 %. Citlivost technik PCR je podstatně vyšší a umožňují detekci jediné buňky v populaci 10^6 normálních buněk. Pro detekci se v tomto případě vyberou dva PCR-primery ze sekvencí sousedících s místy zlomu na každém chromozomu. K amplifikaci dojde pouze v buňkách, kde proběhla translokace, a vznikne fragment konstantní délky (obr. 51). Podobná strategie byla použita k detekci leukémií. Jako výchozí materiál se zde používala mRNA. Výhoda použití mRNA

spočívá v tom, že tato molekula již představuje amplifikační produkt daného genu genomové DNA.

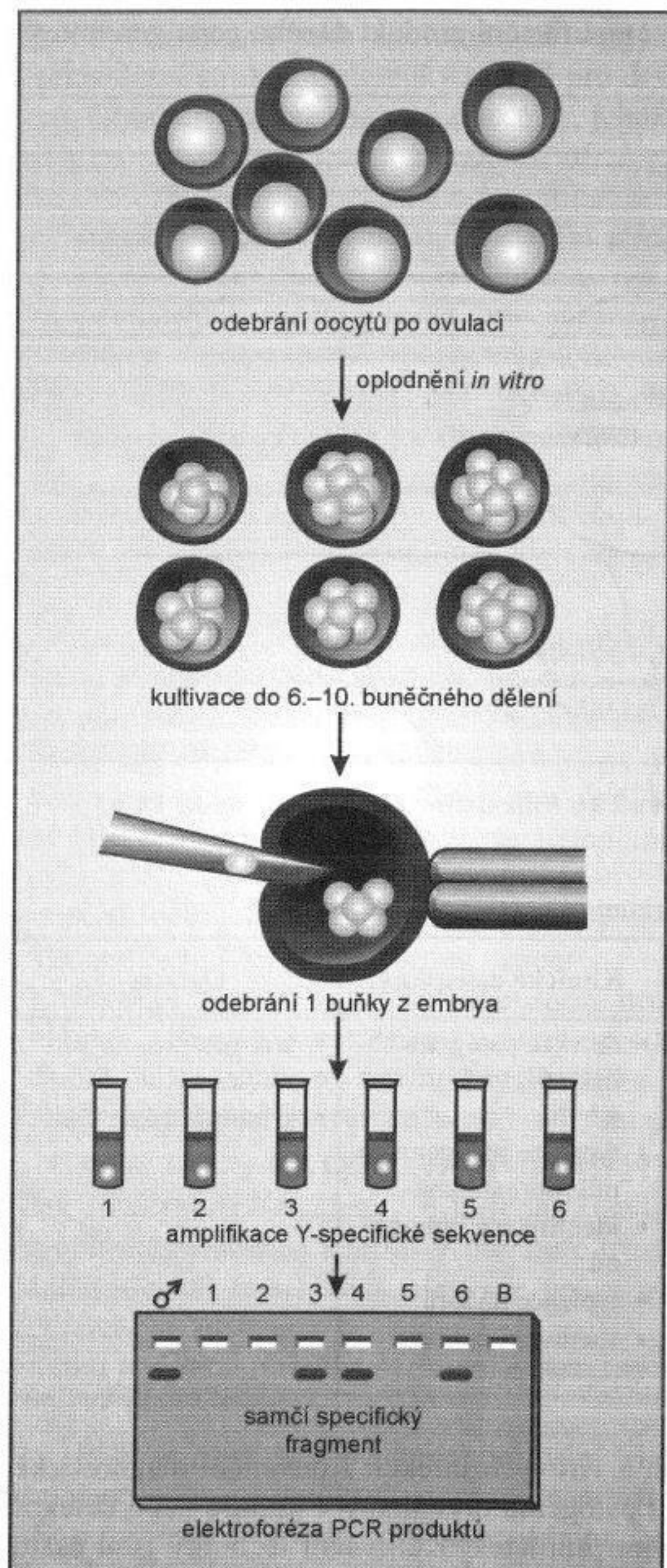


Obr. 51 Detekce translokace mezi chromozomy 14 a 18 u folikulárního lymfomu pomocí PCR

Tabulka 4 Využití PCR a jejích modifikací ve výzkumu a praxi

Základní výzkum	Aplikovaný genetický výzkum	Klinické disciplíny	Ostatní
<ul style="list-style-type: none"> • izolace genů nebo jejich částí • sekvencování DNA • mutageneza in vitro, modifikace konců DNA • analýza klonů z genových knihoven • příprava značených sond 	<ul style="list-style-type: none"> • prenatální diagnostika dědičných chorob • detekce mutací v genech • studium polymorfizmu genů • populační genetika 	<ul style="list-style-type: none"> • detekce patogenních bakterií, virů, prvoků a hub • typizace patogenních mikroorganismů • identifikace onkogenů • typizace nádorů • stanovení pohlaví 	<ul style="list-style-type: none"> • archeologie • soudnictví • kriminalistika

PCR se používá k detekci bakteriálních a virových infekcí. Konvenční diagnostické metody jsou založeny na schopnosti kultivovat patogenní organismy v kultuře nebo detekovat jejich přítomnost u pacienta prostřednictvím protilátek. Kultivační techniky jsou často náročné a vyžadují až několik týdnů (např. u mykobakterií) a navíc některé imunologické metody bývají málo citlivé. Naproti tomu detekce patogenů prostřednictvím PCR, která využívá amplifikaci konzervativní genomové sekvence může detekovat již 10 bakterií mezi 10^6 eukaryotických buněk. Amplifikovaný fragment je pak hybridizován se sondami vysoce specifickými pro daný druh mykobakterie. Spolehlivá a citlivá diagnostika je zvláště důležitá při detekci virů, např. viru HIV (kapitola IX).



Významnou oblastí, která často využívá PCR, je prenatální diagnostika. Příkladem je použití PCR ke stanovení pohlaví u prenatálních buněk. Pro choroby vázané na X-chromozom, které postihují pouze samčí jedince, je prvním krokem stanovení pohlaví. To je možné proto, že samci nesou pouze jeden Y-chromozom, obsahující jedinečné sekvence. Některé repetitivní sekvence jako např. 3,5 kb sekvence DYZ1 se vyskytují v mnoha (až 5 000) kopiích. Takové sekvence lze amplifikovat a získaný PCR-produkt je specifický pro samčí buňky. Při oplození *in vitro* se mikromanipulátorem odebere jedna buňka z rané zygoty, ze které se izoluje DNA a ta se podrobí amplifikaci pomocí specifických primerů (obr. 52). Přítomnosti Y-specifického amplikonu se pak využívá v genetickém poradenství.

Obr. 52 Stanovení pohlaví u prenatálních buněk pomocí PCR

2. Varianty a modifikace PCR

Polymerázová řetězová reakce je používána v široké škále variant, které jsou upraveny podle toho, zda je potřeba amplifikovat templáty s nízkým počtem kopií, detekovat sekvenční polymorfizmy, provádět molekulární identifikaci nebo typizaci organismů nebo modifikovat sekvence nukleových kyselin. Tyto varianty se navzájem liší použitím dalších enzymatických reakcí kromě amplifikace *Taq* DNA-polymerázou, použitím specifických sekvencí primerů, přísností podmínek pro amplifikaci a způsoby detekce produktů PCR.

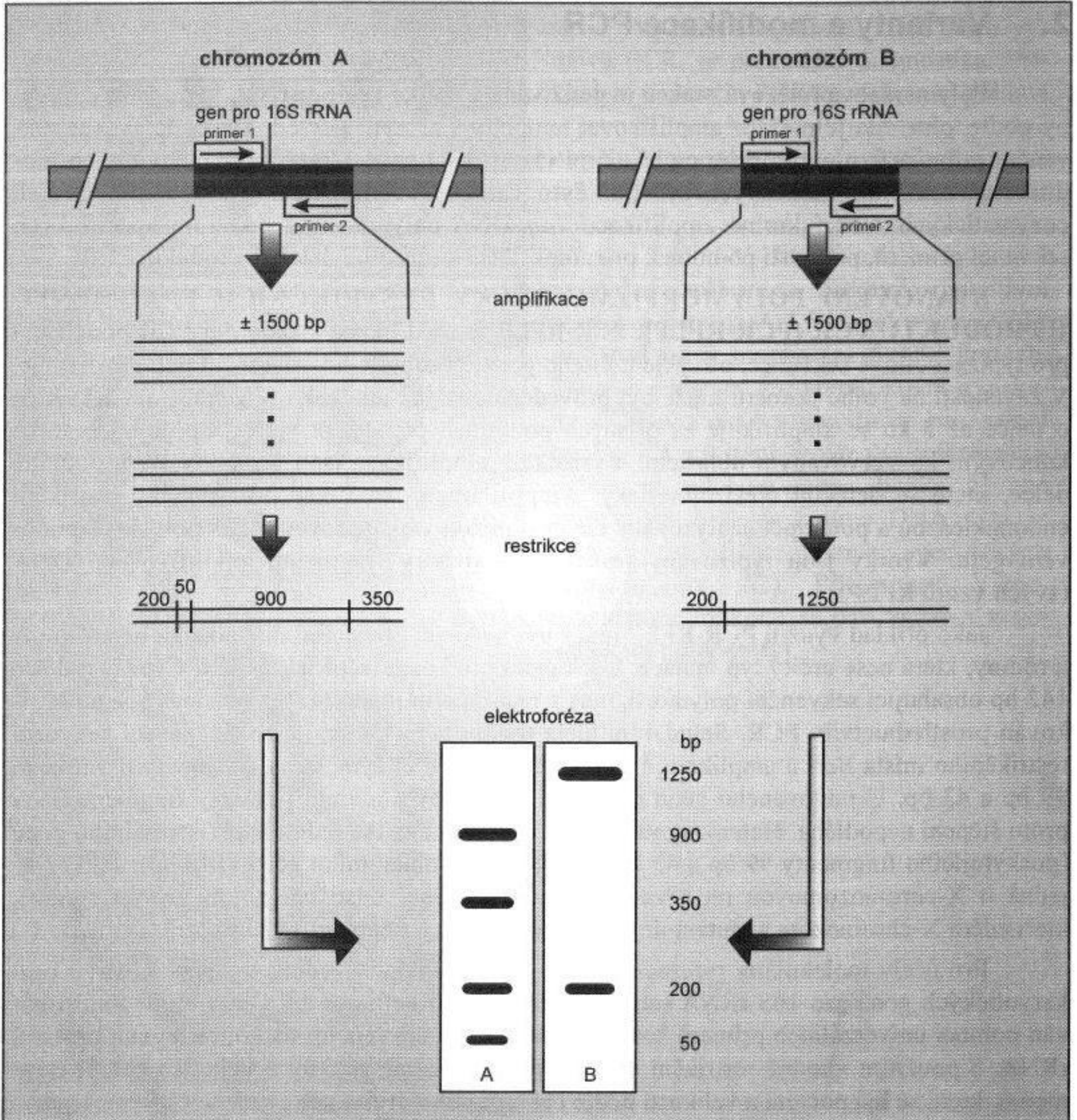
STANOVENÍ POLYMORFIZMU DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ U PRODUKTŮ PCR (PCR-RFLP). PCR-RFLP je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, obsahujícího sekvenční polymorfismus. V závislosti na volbě primerů může být provedena analýza jakéhokoliv genu. Tato sekvence o délce až 5 kb se amplifikuje za přísných podmínek pomocí primerů připojujících se ke koncovým konzervovaným oblastem. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR o stejné délce, které se detekují elektroforeticky. Amplifikované produkty jsou štěpeny restriční endonukleázou a poté opět analyzovány elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu. Vzorok jsou typizovány restričními spektry fragmentů amplifikované DNA (svých vzorů RFLP).

Jako příklad využití PCR-RFLP může být uvedena prenatální diagnostika hemofilie A u rodiny, která nese určitý typ mutace. Úsek genu pro koagulační faktor VIII (Xp28) o délce 142 bp obsahující sekvenční polymorfismus v restričním místě *BclI* v intronu 18 je amplifikován prostřednictvím PCR. Standardní alela tohoto genu obsahuje rozpoznávací sekvenci restričního místa *BclI* a amplikon je proto štěpen tímto enzymem na fragmenty o velikosti 99 bp a 43 bp. U mutovaného genu restriční místo chybí a amplifikovaný fragment DNA proto štěpení nepodléhá. Heterozygotní matka – přenašečka má jednu kopii normálního genu (poskytujícího fragmenty 99 bp a 43 bp) a jednu kopii mutantního genu (142 bp). Jelikož se jedná o X-chromozomovou recesivně dědičnou chorobu, postižení potom bývají synové, kteří zdědí X-chromozom s mutantním genem (neštěpený fragment 142 bp).

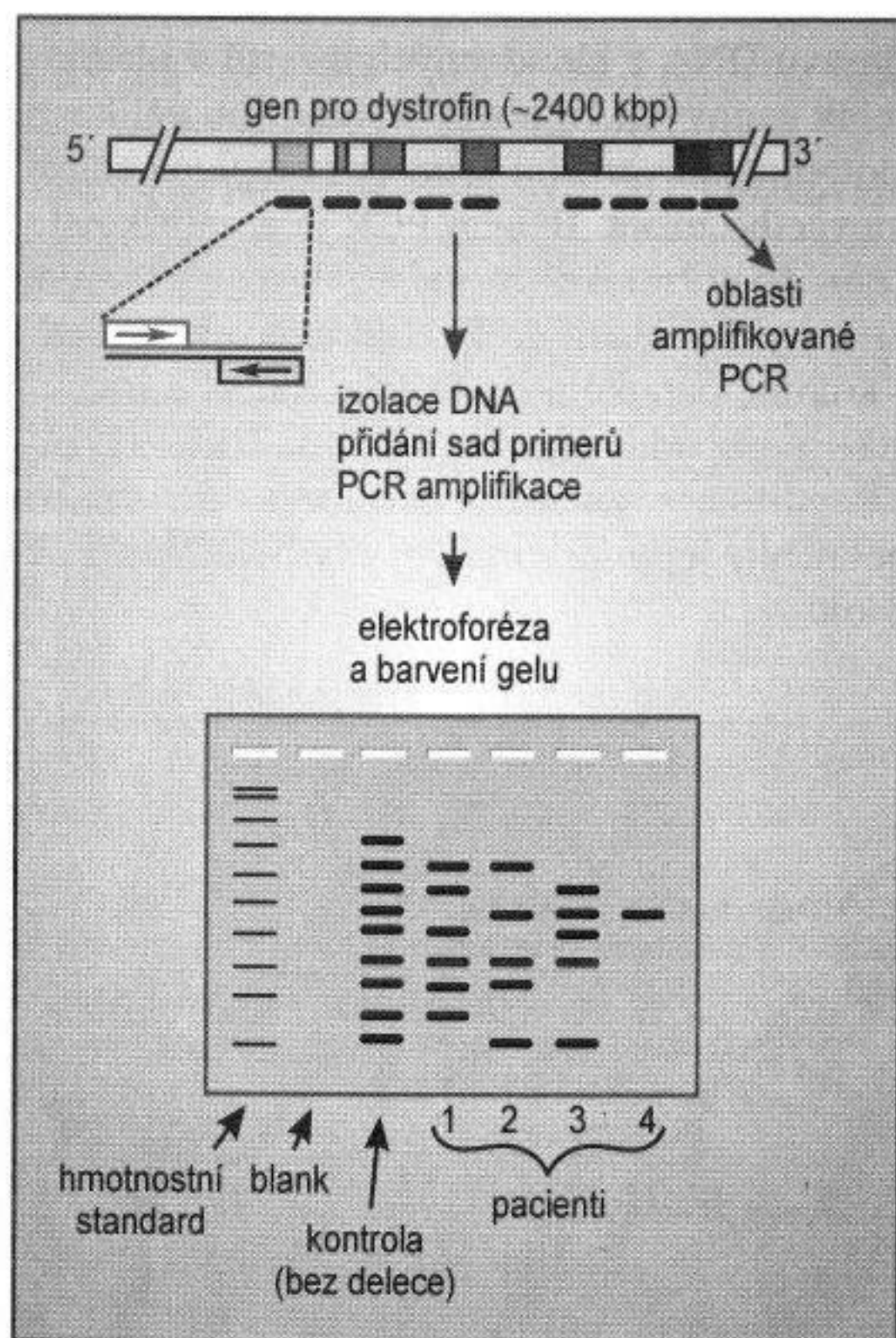
Pro účely molekulární typizace může být jako příklad uvedena analýza RFLP u prokaryotických genů pro 16S rRNA (obr. 53). Celý gen o velikosti asi 1 600 bp je amplifikován pomocí univerzálních primerů komplementárních k sekvencím na koncích genu pro 16S rRNA. S použitím vhodné restriční endonukleázy získáme spektrum několika (až 8) fragmentů, které se liší počtem a velikostí podle bakteriálního druhu nebo kmene.

MNOHONÁSOBNÁ („MULTIPLEX“) PCR. Mnohonásobná PCR je taková varianta PCR, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožňuje detekci několika genů současně v jedné reakční směsi. Reakční podmínky pro současnou amplifikaci všech produktů je nutno empiricky, krok za krokem optimalizovat. Hlavní výhodou této varianty jsou nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích a proto se používá pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA, testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky.

Příkladem využití mnohonásobné PCR je diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie kdy se provádí detekce deletovaných exonů. V dystrofinovém genu (Xp21) o délce 2 400 kbp je navrženo celkem 9 úseků určených k amplifikaci. Tyto úseky představují části genu, které bývají nejčastěji postiženy delecí. Vzorok DNA z pacienta jsou amplifikovány za současného použití sady devíti primerů v jedné reakci a produkty jsou elektroforeticky separovány (obr. 54).



Obr. 53 Typizace genu pro 16S rRNA pomocí metody PCR-RFLP

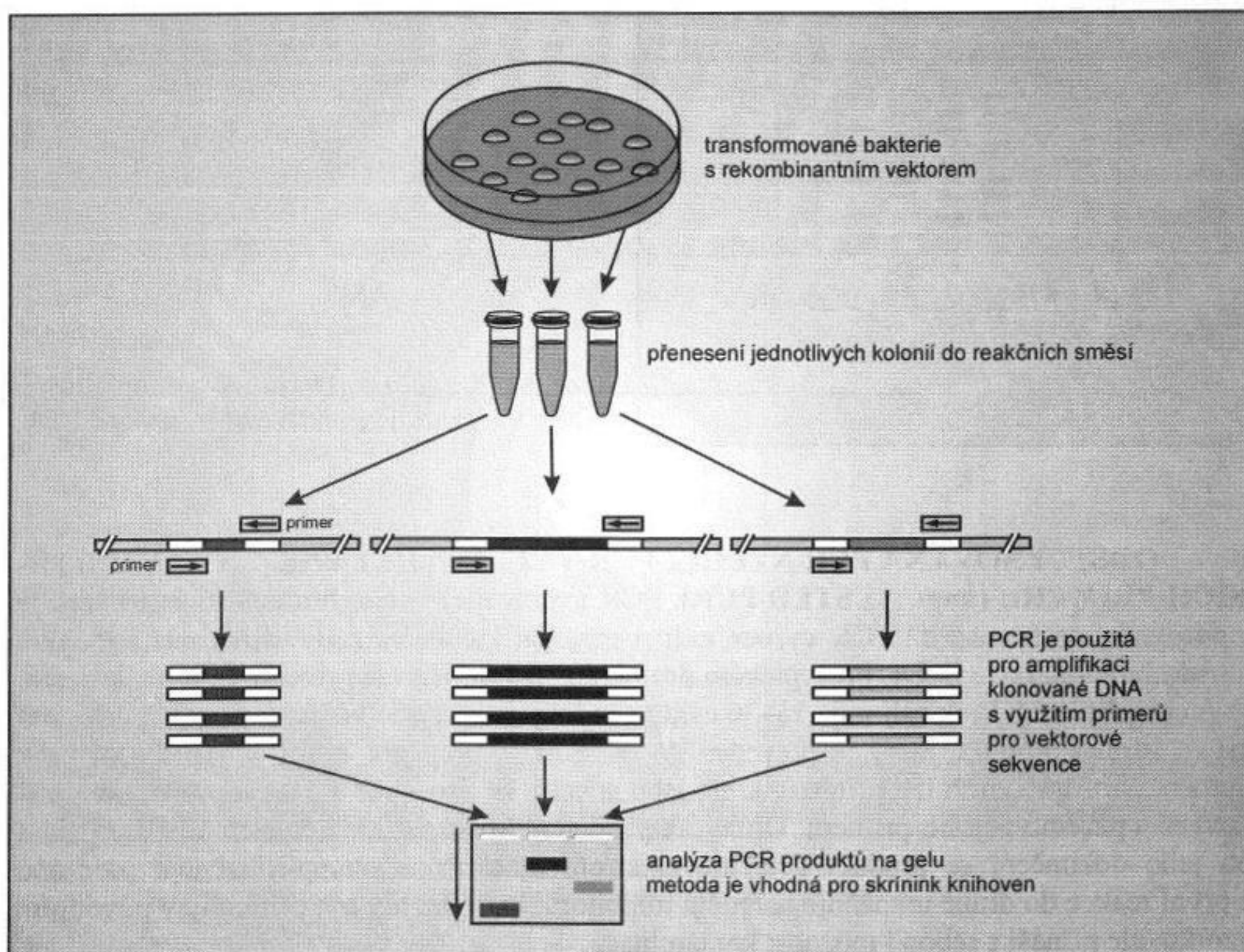


Obr. 54 Diagnóza Duchennovy muskulární dystrofie pomocí mnohonásobné PCR

ODSTUPŇOVANÁ PCR NEBOLI PCR VYUŽÍVAJÍCÍ VNĚJŠÍCH A VNITŘNÍCH PRIMERŮ (angl. NESTED PCR). PCR využívající vnějších a vnitřních primerů je v porovnání se standardní PCR vysoce citlivá metoda, která umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA. Při typickém protokolu se amplifikace provádí ve dvou krocích. První amplifikační krok zahrnuje 15–30 cyklů s jedním párem tzv. vnějších primerů. V tomto kroku vzniká produkt, který je převeden do nové zkumavky pro druhý amplifikační krok pomocí páru tzv. vnitřních primerů, které jsou specifické pro vnitřní část sekvence amplifikované s párem vnějších primerů. Druhý amplifikační krok zahrnuje dalších 15–30 cyklů a po jeho dokončení se produkt detekuje elektroforézou. Přenos amplifikačních produktů z první reakce do druhé umožňuje naředění inhibitorů, které mohly být přítomny v původním vzorku, ale přináší s sebou i možnost kontaminace.

Pro odstupňovanou PCR byly popsány i protokoly zahrnující různé přístupy pro provedení reakce v jedné zkumavce. Obsah prvního amplifikačního kroku může být oddělen od obsahu druhého amplifikačního kroku silnou přepážkou z minerálního oleje; po první amplifikaci jsou reakční komponenty smíchány mikrocentrifugací a obsah je amplifikován znovu. Častěji se však navrhuje páry vnějších a vnitřních primerů, které se podstatně liší teplotou T_m . První amplifikace s párem vnějších primerů se provádí při málo přísných podmínkách (nízká teplota pro hybridizaci primeru) s 10–15 cykly. Jejím výsledkem je směs produktů jak vnitřních a vnějších primerů, tak jejich kombinace. Následuje druhotná amplifikace zahrnující 15–30 cyklů při přísných podmínkách (optimální teplota pro hybridizaci primeru) s vnitřními primery, jejichž konce jsou často bohaté na báze G+C a tak upřednostňují amplifikaci vnitřního produktu, který je detekován elektroforézou.

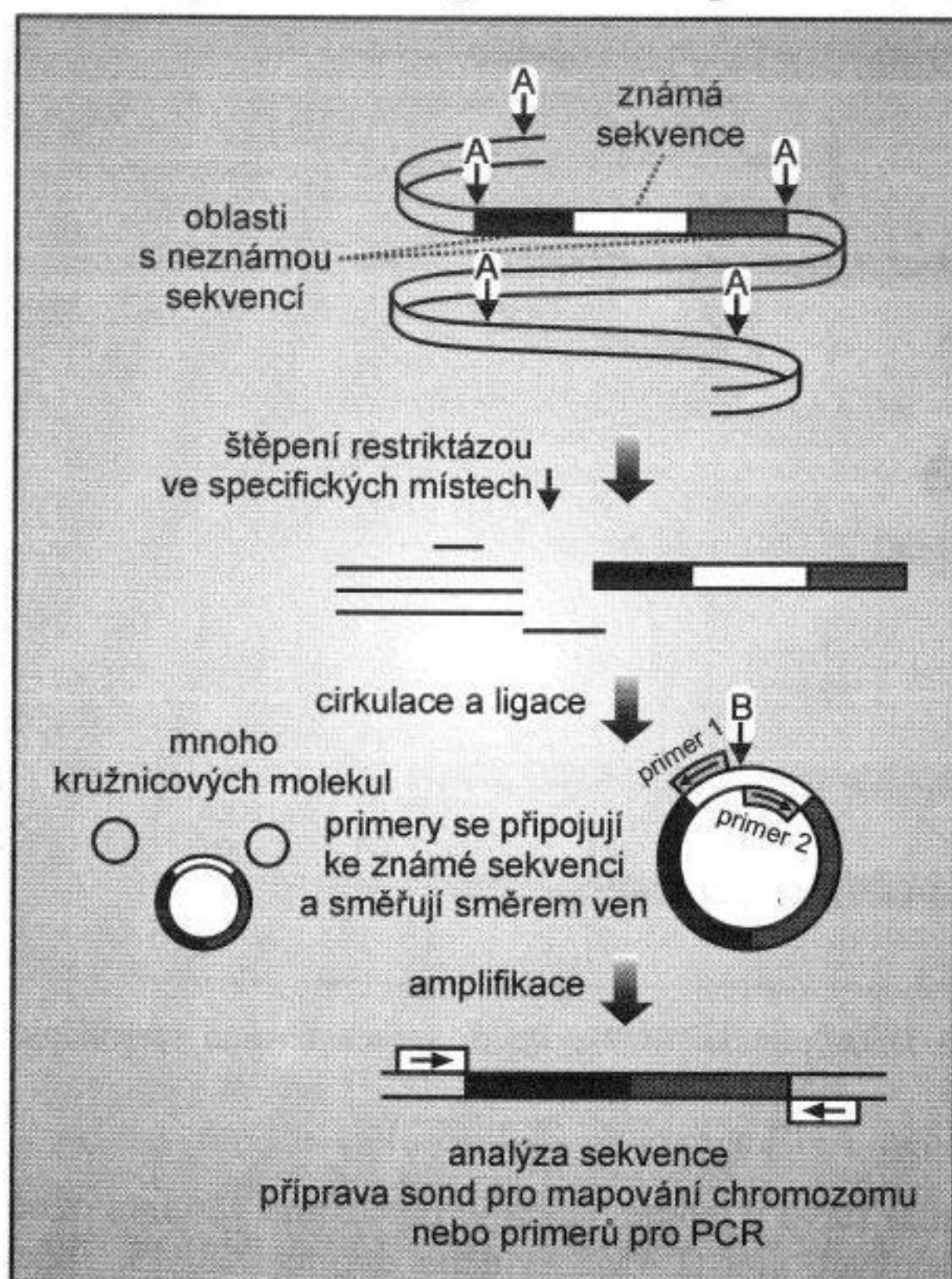
PCR KOLONIÍ. PCR je vhodná pro přípravu DNA z klonovaných inzertů v plazmidových nebo fágových vektorech, případně skřinink genových knihoven a stanovení velikosti a orientace inzertu. Pro tuto variantu PCR jsou potřebné univerzální primery komplementární k vektorovým sekvencím na obou stranách klonovacího místa. Během PCR je amplifikován jakýkoliv inzert bez ohledu na jeho sekvenci (obr. 55). Protokol metody zahrnuje přípravu reakční směsi obsahující všechny potřebné složky, její rozdělení do PCR-zkumavek, následné přenesení části bakteriální nebo kvasinkové kolonie párátkem do reakční směsi a roztřepání buněk. Zbytek bakteriální kolonie se uchová pro případnou izolaci vektoru. Buňky lyzují během počátečního denaturačního cyklu. Amplifikace začíná v prvním cyklu s nižší teplotou pro připojení primeru (např. 45 °C) a pokračuje jejím postupným zvyšováním o 1 až 2 °C v následujících cyklech až na optimální teplotu.



Obr. 55 Skřinink genové knihovny metodou PCR kolonií

OBRÁCENÁ NEBOLI INVERZNÍ PCR (IPCR). Inverzní PCR je varianta umožňující amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci ohraničené na obou stranách DNA se známou sekvencí (obr. 56). Primery pro inverzní PCR jsou navrženy na koncích známé sekvence tak, že jejich 3'-konce směřují od sebe a mají mezi sebou restrikční místo (B) o délce 6 bp. V prvním kroku je genomová DNA štěpena vhodnou restrikční endonukleázou (A) s rozpoznávacím místem o 4 bp, tak aby délka restrikčních fragmentů byla vhodná pro PCR. V druhém kroku se provede ligace T4 DNA-ligázou, jejímž výsledkem je cirkularizace restrikčních fragmentů. Aby bylo dosaženo jednomolekulární ligace, je třeba v reakčních podmínkách zvolit vhodné ředění. Kružnicové DNA obsahující známou sekvenci se potom

linearizují štěpením v restrikním místě B, jehož výsledkem jsou fragmenty s cílovou sekvencí nacházející se mezi zbytky známé sekvence na obou koncích fragmentu. Neznámá sekvence je následně amplifikována. Opakovaná inverzní PCR může být použita k procházení



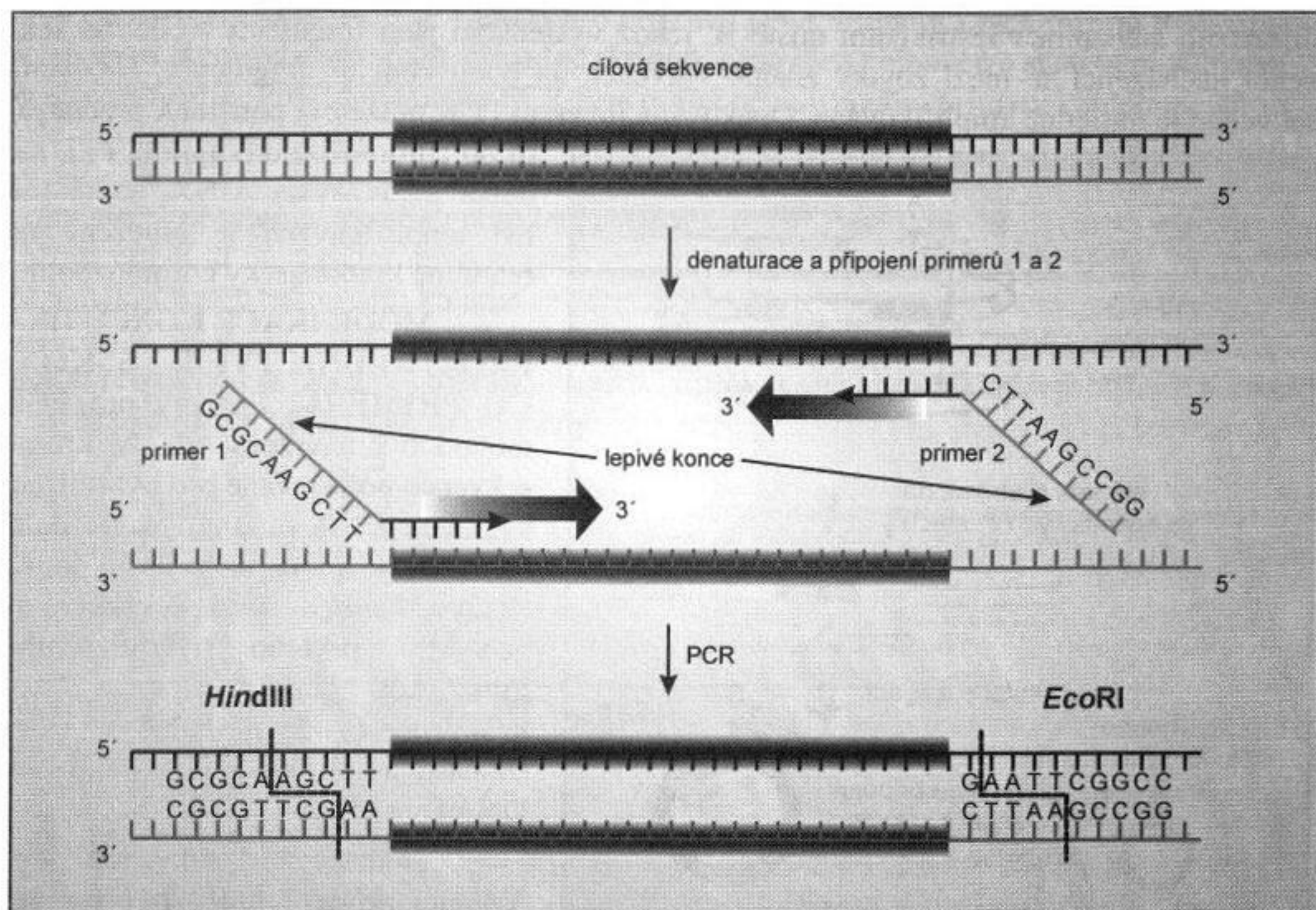
Obr. 56 Princip obrácené polymerázové řetězové reakce (IPCR). Místa pro štěpení různými restrikními endonukleázami jsou označena A a B

ni po chromozomu (kapitola IV), ale délka analyzované DNA, která má být amplifikována je omezená na relativně krátké úseky chromozomu.

MODIFIKACE KONCŮ DNA PROSTŘEDNICTVÍM 5'-KONCŮ PRIMERŮ. Primery pro PCR mohou být navrženy tak, že kromě sekvence požadované pro hybridizaci s cílovou DNA obsahují navíc další sekvenci adaptoru na svém 5'-konci (lepivý konec). Tato sekvence se neúčastní prvního hybridizačního kroku, kdy hybridizuje pouze 3'-konec primeru, ale následně se stává součástí amplifikovaného fragmentu DNA (obr. 57).

Dodatečná sekvence na 5'-konci primeru může být zvolena zcela libovolně a poskytuje širokou přizpůsobivost pro modifikaci konců DNA. Přidávané sekvence obsahují nejčastěji restrikní místa pro snadné klonování produktů PCR nebo promotory, terminátory a translační signály (EC-PCR).

ALELOVĚ SPECIFICKÁ PCR (AS-PCR). Pro detekci bodových mutací v genomech je AS-PCR prováděna ve dvou nebo více paralelních reakcích. V první reakci je jeden primer komplementární ke standardní sekvenci a v další reakci k mutantní nebo polymorfní sekvenci. Druhý primer je v obou reakcích stejný. Předpokládá se, že k elongaci dojde pouze tehdy, pokud jsou primer a cílová sekvence plně komplementární. V případě homozygotního stavu bude k amplifikaci docházet pouze v jedné z reakcí. Metoda byla popsána nezávisle pod různými označeními a využívá dva odlišné přístupy. První přístup je založen na chybějící elongaci v důsledku chybného párování bází na 3'-konci primeru. Tento systém se nazývá **amplifikací nedostupný mutační systém (ARMS)**, PCR-amplifikace specifických alel (PASA) nebo **alelově specifická amplifikace (ASA)**. Ve druhém přístupu k chybnému párování bází dochází ve střední části sekvence primeru a brání tak hybridizaci primeru k cílovému místu v případě, že se v templátové DNA vyskytuje. Metoda využívající tento princip se nazývá **kompetitivní připojení oligonukleotidu (COP)**.

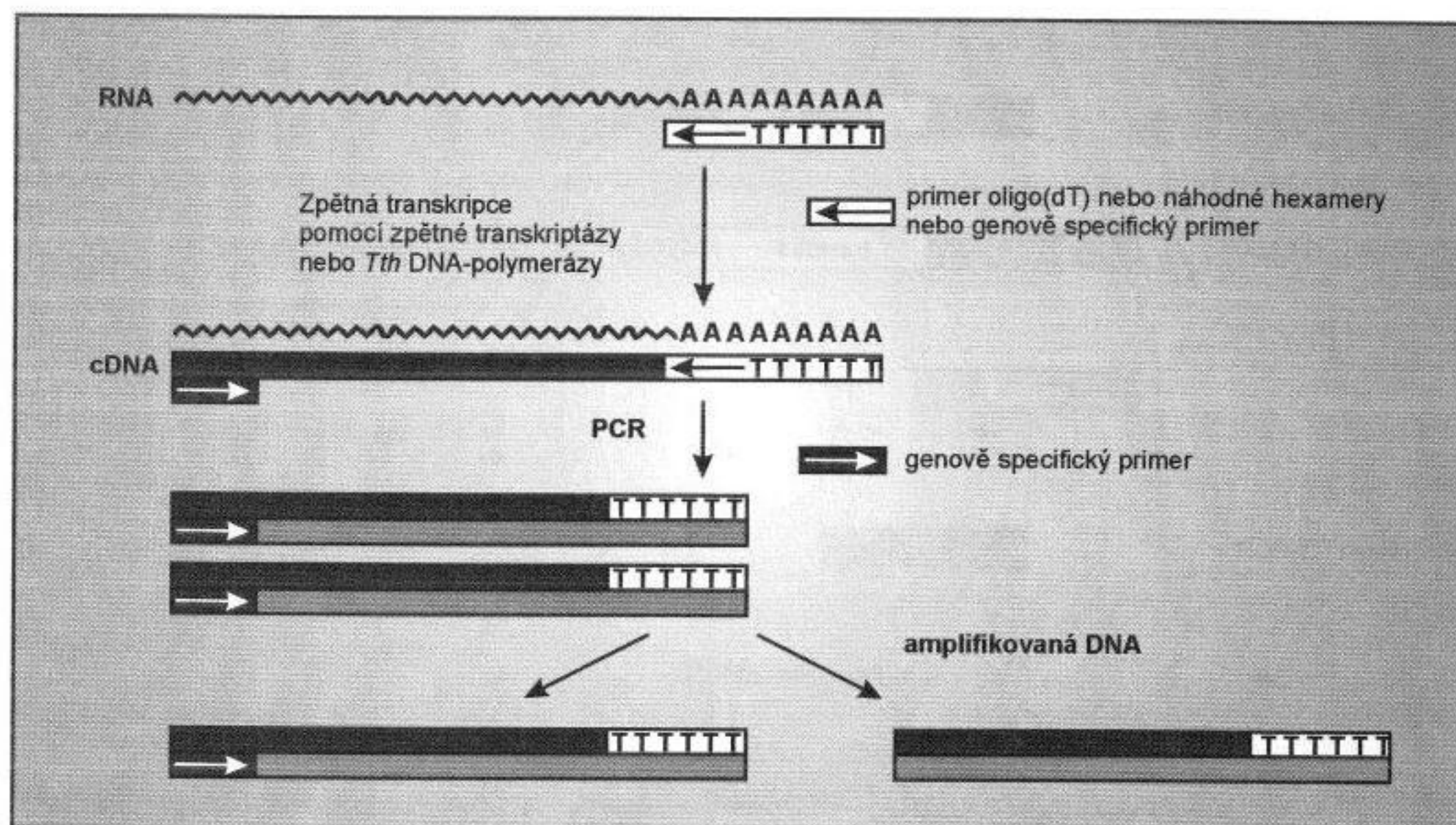


Obr. 57 Modifikace konců dvouřetězcové DNA pomocí PCR-primerů se sekvencemi restričních míst

Pro snazší odlišení heterozygotního stavu v jediné reakci je používána varianta označená jako PCR-amplifikace více specifických alel (PAMSA) nebo dvojitý ARMS. Jeden z alelově-specifických primerů obsahuje na 5'-konci přídatný úsek několika nekomplementárních nukleotidů, a tak mohou být amplifikační produkty obou alel rozlišeny na základě své délky. Metoda je obecně velmi citlivá na optimalizaci experimentálních podmínek reakce, zejména koncentrace jednotlivých reagentů a templátové DNA. Úspěšně se používá pro rozlišení homozygotního a heterozygotního stavu v nejrůznějších klinických aplikacích.

ZPĚTNÁ PCR (RT-PCR). RT-PCR je metoda určená k amplifikaci molekul RNA. RNA nemůže sloužit jako templát pro PCR, a proto se produkty tvoří pouze tehdy, jestliže je izolovaná RNA nejdříve převedena do cDNA retrovirovou zpětnou transkriptázou (např. zpětnou transkriptázou viru M-MuLV nebo AMV) a následně amplifikována PCR se dvěma specifickými primery standardním postupem (obr. 58).

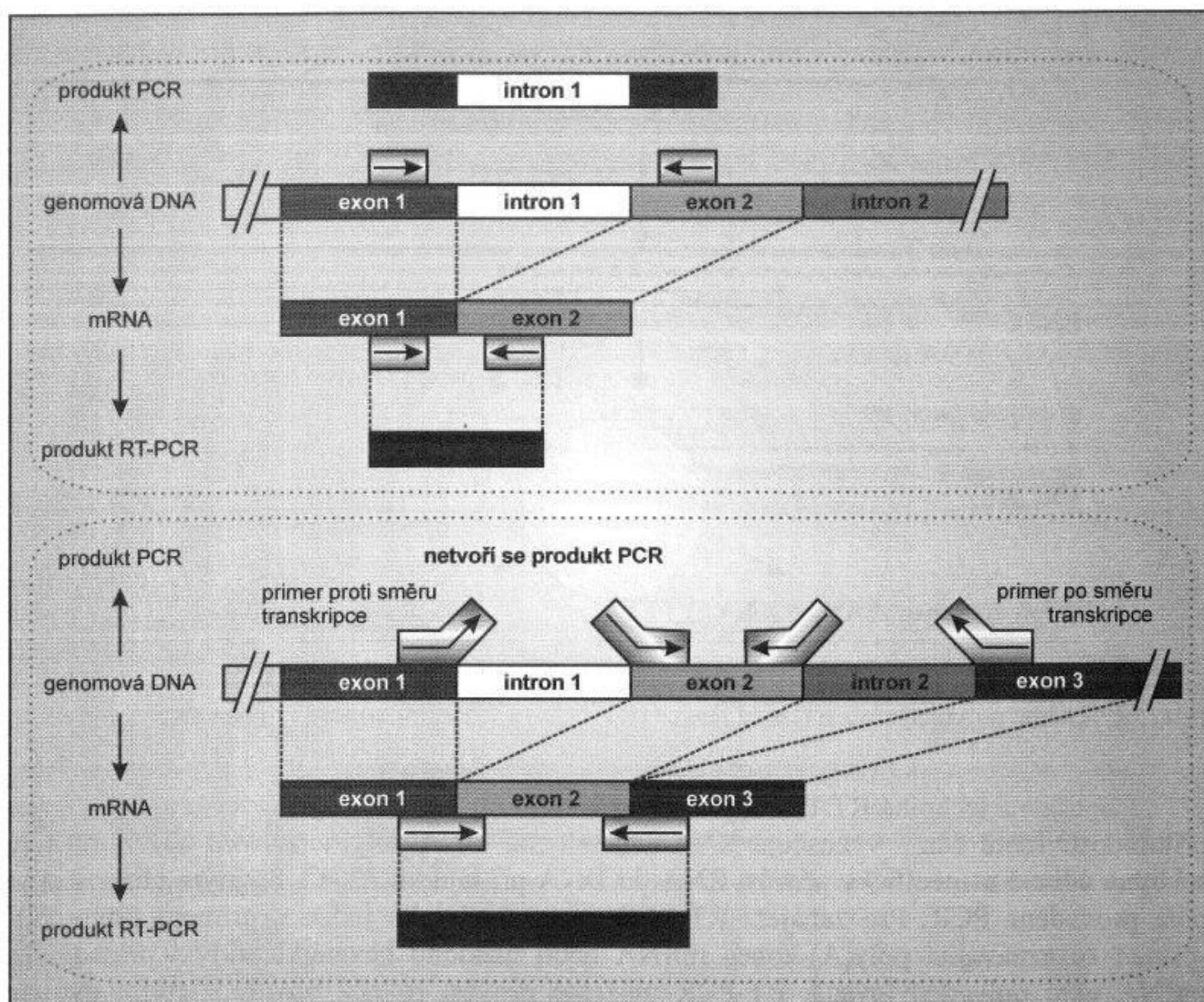
Nevýhodou zpětné transkriptázy je její termolabilita. Enzym ztrácí funkčnost již při teplotách nad 42 °C a proto je stringence zpětné transkripce RNA na cDNA relativně nízká. Navíc v některých případech, zejména při stabilní složité sekundární struktuře RNA je zneemožněn přepis RNA do cDNA. Výhodou naopak může být možnost optimalizovat samostatně zpětnou transkripci a samostatně PCR a také snadná syntéza dlouhých produktů o délce až 14 kb.



Obr. 58 Zpětná polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) s využitím oligo(dT)-primeru

Současná technika RT-PCR využívá termostabilní *Tth* DNA-polymerázu, která se za přítomnosti iontů Mn^{2+} vyznačuje RNA-dependentní DNA-polymerázovou aktivitou a je schopná účinně a specificky převést RNA do DNA při teplotě 72 °C. Stejným enzymem je poté prováděna PCR. Pro zahájení RT-PCR se využívá jako jeden z primerů oligo(dT)-primer rozeznávající poly(A)-konec mRNA nebo náhodné hexanukleotidy v případě, že mRNA není polyadenylována. RT-PCR můžeme provést rovněž prostřednictvím dvojice specifických primerů, které jsou navrženy tak, aby bylo možné odlišit produkty vznikající při RT-PCR a při standardní PCR s genomovou DNA, která může vzorky pro RT-PCR často kontaminovat (obr. 59). Pokud se místně specifické primery připojují k sekvenci 2 exonů na obou stranách určitého intronu, amplifikační produkt z genomové DNA je větší než produkt RT-PCR. Pokud mají navržené primery vazebnou sekvenci na spojení exon/exon, neamplifikují genomovou DNA vůbec. RT-PCR a její modifikace jako DDRT-PCR (diferenciální display RT-PCR) nacházejí praktické využití při studiu úrovně exprese genů (kapitola VIII) a v molekulární diagnostice zejména některých virových genomových nukleových kyselin, které jsou přítomny pouze jako RNA (kapitola IX).

RYCHLÁ AMPLIFIKACE KONCŮ cDNA (RACE). Syntéza cDNA z mRNA o úplné délce není pomocí RT-PCR snadná, protože často není dostupná celá sekvence transkriptu. K usnadnění klonování cDNA o úplné délce se pomocí RACE amplifikují kratší úseky od obou konců poté, co byla stanovena část sekvence cDNA jinými metodami. RACE umožňuje získat kompletní sekvence cDNA během několika dní. Dělí se na 5'-RACE a 3'-RACE. Pro použití RACE je nezbytná znalost části sekvence uvnitř molekuly mRNA, ve které je navržen specifický primer, který je orientován ve směru 3' nebo 5' a umožňuje produkci překrývajících se fragmentů cDNA.

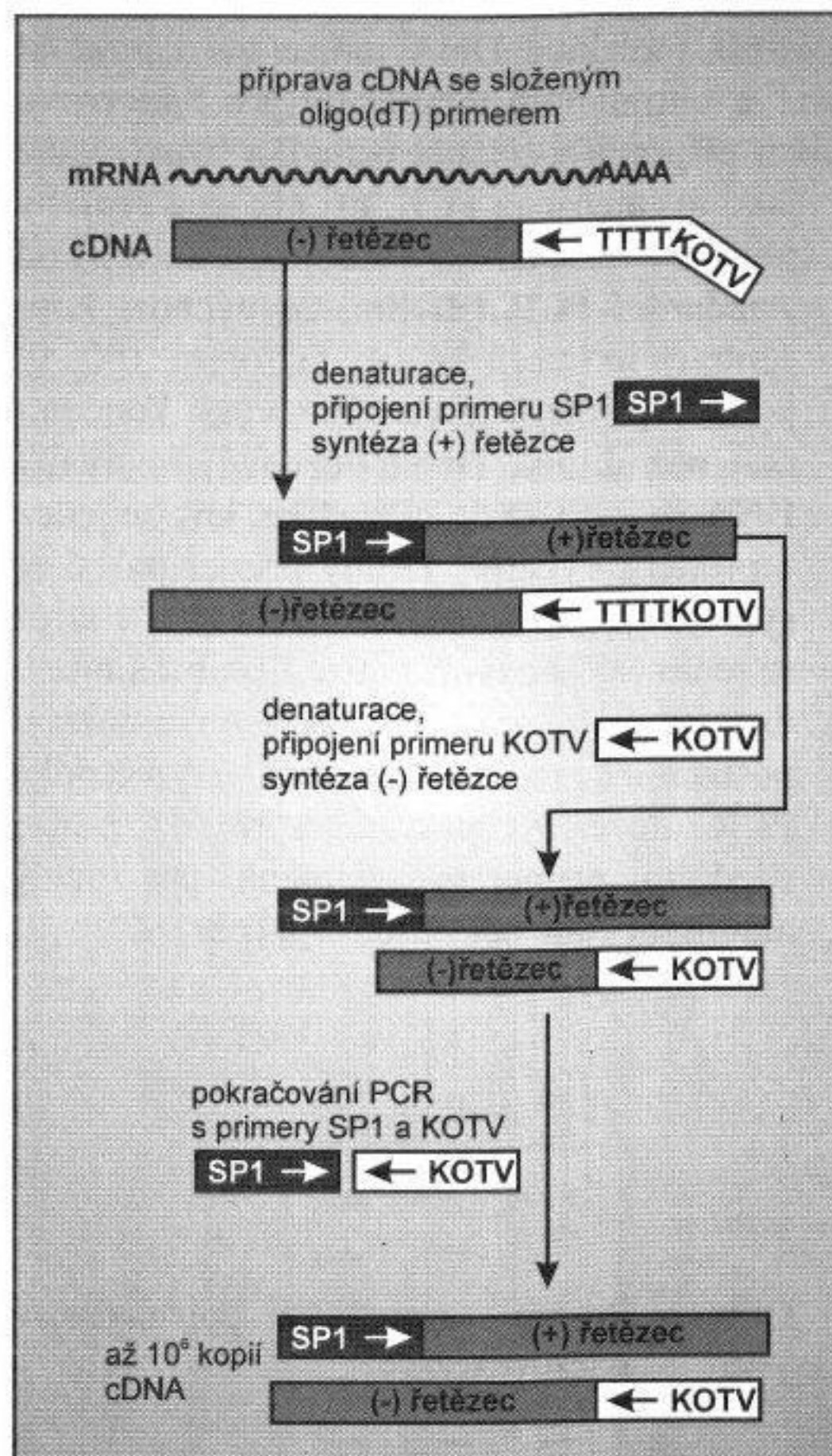


Obr. 59 Dva přístupy pro návrh primerů umožňujících odlišit produkty vznikající při RT-PCR a při standardní PCR s genomovou DNA

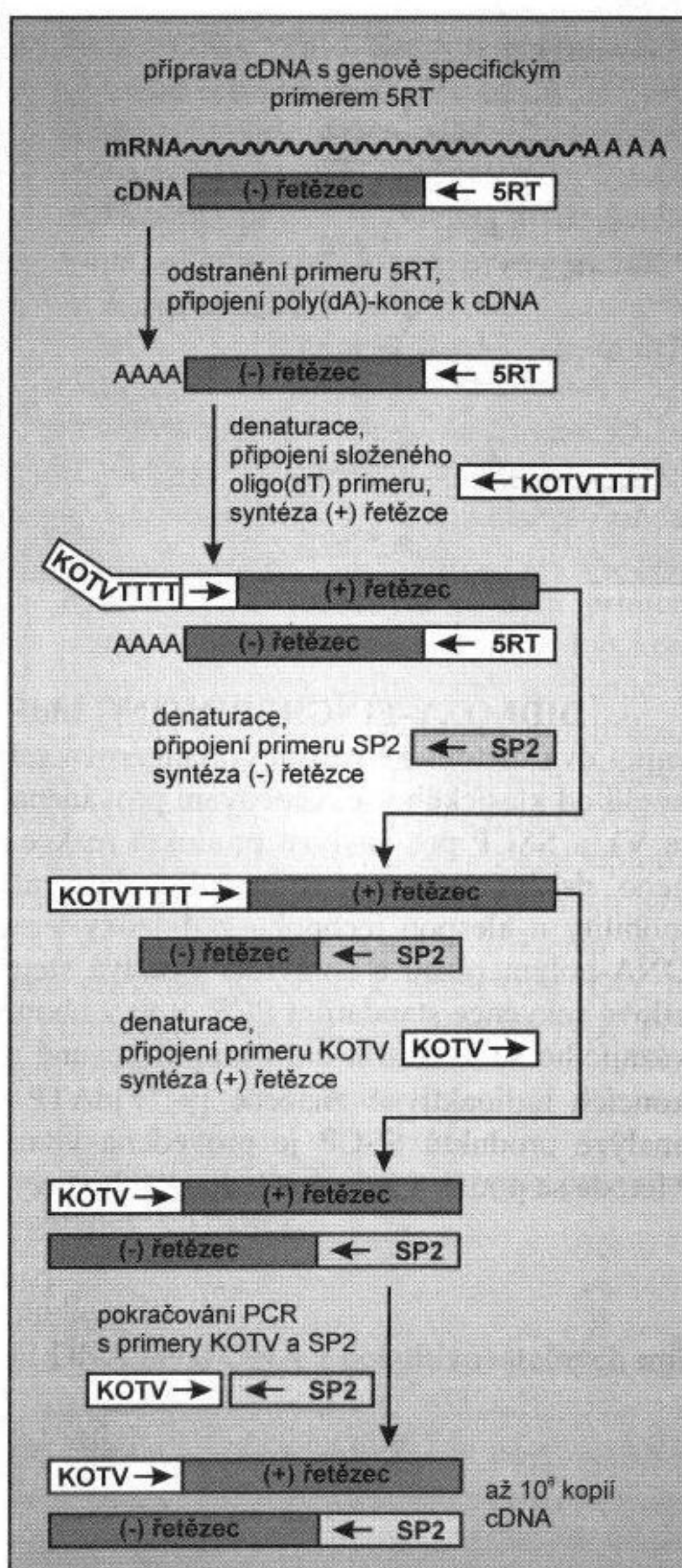
3'-RACE využívá výhody přirozeného poly(A)-konce na mRNA jako místa pro zahájení PCR amplifikace (obr. 60). Pro zpětnou transkripci od 3'-konce se použije složený primer obsahující 17 zbytků oligo(dT) navázaných na 17-mer kotevní adaptor (KOTV). Adaptor má vyšší T_m než oligo(dT) a je vhodné, aby nesl restriční místa pro klonování. Pro PCR se pak použije primer komplementární k adaptoru a druhý, genově specifický primer navržený ze střední části cDNA.

Při **5'-RACE** je cDNA syntetizována za použití genově specifického primeru SP1 a zpětné transkriptázy (obr. 61). Reakční produkt zpětné transkripce je pak purifikován od nukleotidů a primerů a vybaven 3'-poly(dA)-koncem připojeným terminální transferázou. cDNA s napojeným koncem je pak amplifikována PCR s použitím vnějšího genově specifického primeru SP2, složeného primeru oligo(dT) s kotevním adaptorem (KOTV) a *Taq* DNA-polymerázy. Získaná cDNA může být dále amplifikována prostřednictvím další PCR využívající vnitřního primeru SP3 a primeru komplementárního k adaptoru.

AMPLIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN

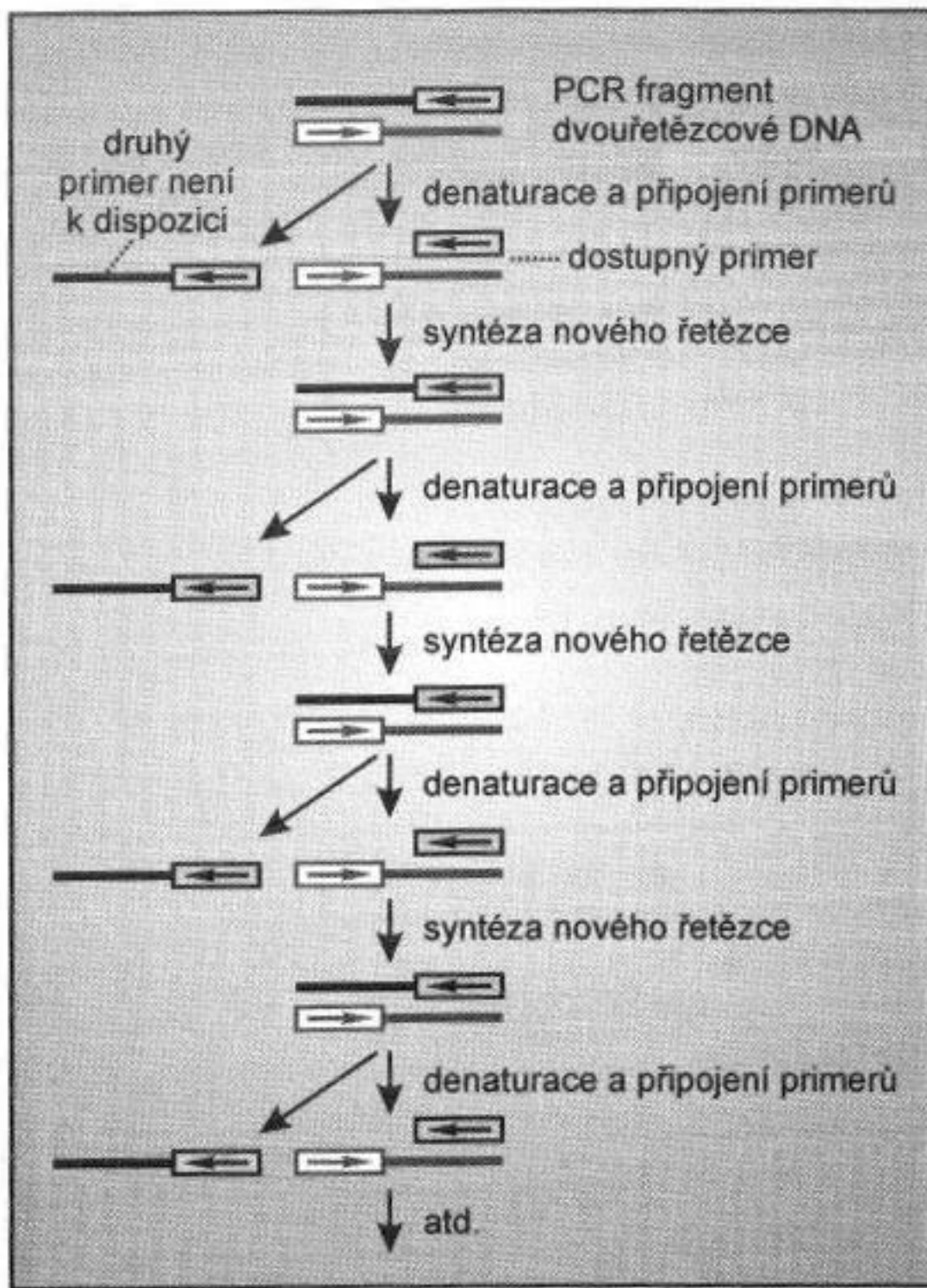


Obr. 60 Princip 3'-RACE s adaptorovým oligo(dT) primerem a genově specifickým primerem SP1



Obr. 61 Princip odstupňované 5'-RACE s genově specifickými primery 5RT a SP2

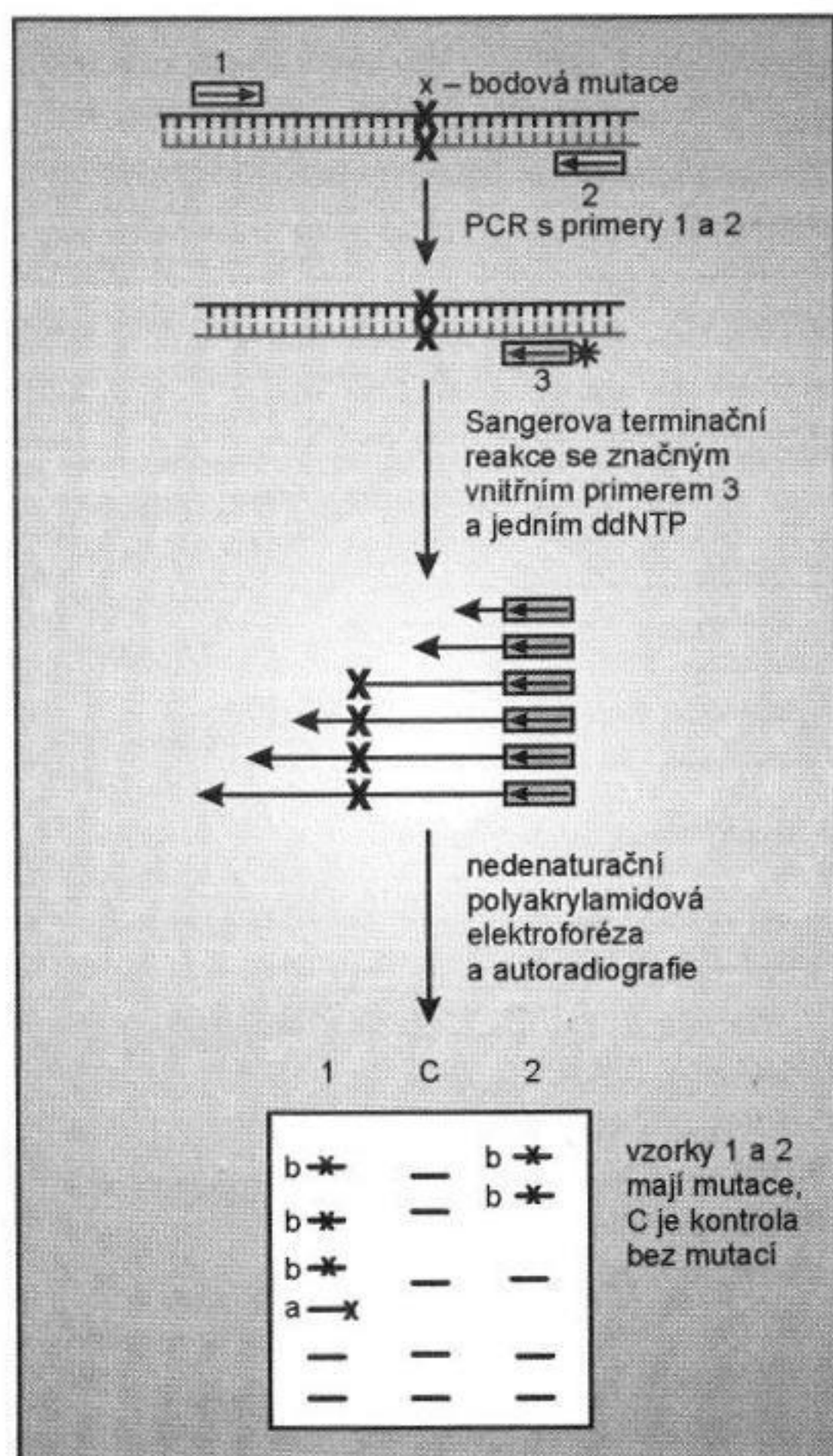
ASYMETRICKÁ PCR. Podobně jako každá molekula DNA, může být i produkt PCR podroben sekvencování. Vzhledem k tomu, že optimálním templátem pro Sangerovu metodu sekvencování jsou ssDNA, byla pro jejich přípravu vyvinuta technika označovaná



jako asymetrická PCR, při níž jsou tvořeny preferenčně ssDNA. Tato modifikace se od standardní PCR liší tím, že výchozí koncentrace primerů se liší faktorem 100, tj. jeden z primerů je ve 100× vyšší koncentraci než druhý. Dvouřetězcové fragmenty DNA se tvoří až do okamžiku, kdy se jeden z primerů vyčerpá. Druhý primer pak dále syntetizuje pouze jeden z řetězců a i když se tento řetězec tvoří pouze lineárně a nikoli exponenciální rychlostí, je jeho množství postačující pro sekvencování. Asymetrická PCR může být prováděna rovněž pouze s jedním primerem, zejména pro účely automatického sekvencování (obr. 62).

Obr. 62 Princip asymetrické polymerázové řetězové reakce

DIDEOXY-FINGRPRINTING (ddF). ddF je hybridní diagnostická technika využívající dva metodické přístupy, Sangerovu sekvenační reakci asymetrickou PCR, která je na rozdíl od klasického sekvencování prováděna pouze s jedním dideoxy-terminátorem (kapitola V), a SSCP pro analýzu produktů reakce. Mutace jsou detekovány jako výsledek ztráty nebo získání dideoxy-terminačního segmentu a nebo na základě rozdílné elektroforetické mobility u alespoň jednoho z dideoxy-terminačních segmentů. Reakce se provádí s *Taq* DNA-polymerázou a zpravidla využívá stejných primerů, které byly použity k amplifikaci cílové sekvence standardní PCR, a to v obou směrech 5' a 3' a nebo pomocí dalšího primeru vázajícího se k vnitřní části amplifikované sekvence (obr. 63). Používané primery jsou na koncích radioaktivně značené [γ - 32 P]dATP prostřednictvím T4 polynukleotid kinázy. Po analýze produktů SSCP je provedena vizualizace výsledného fingerprintu autoradiografií. Metoda se používá zejména k detekci bodových mutací u eukaryotických genů.



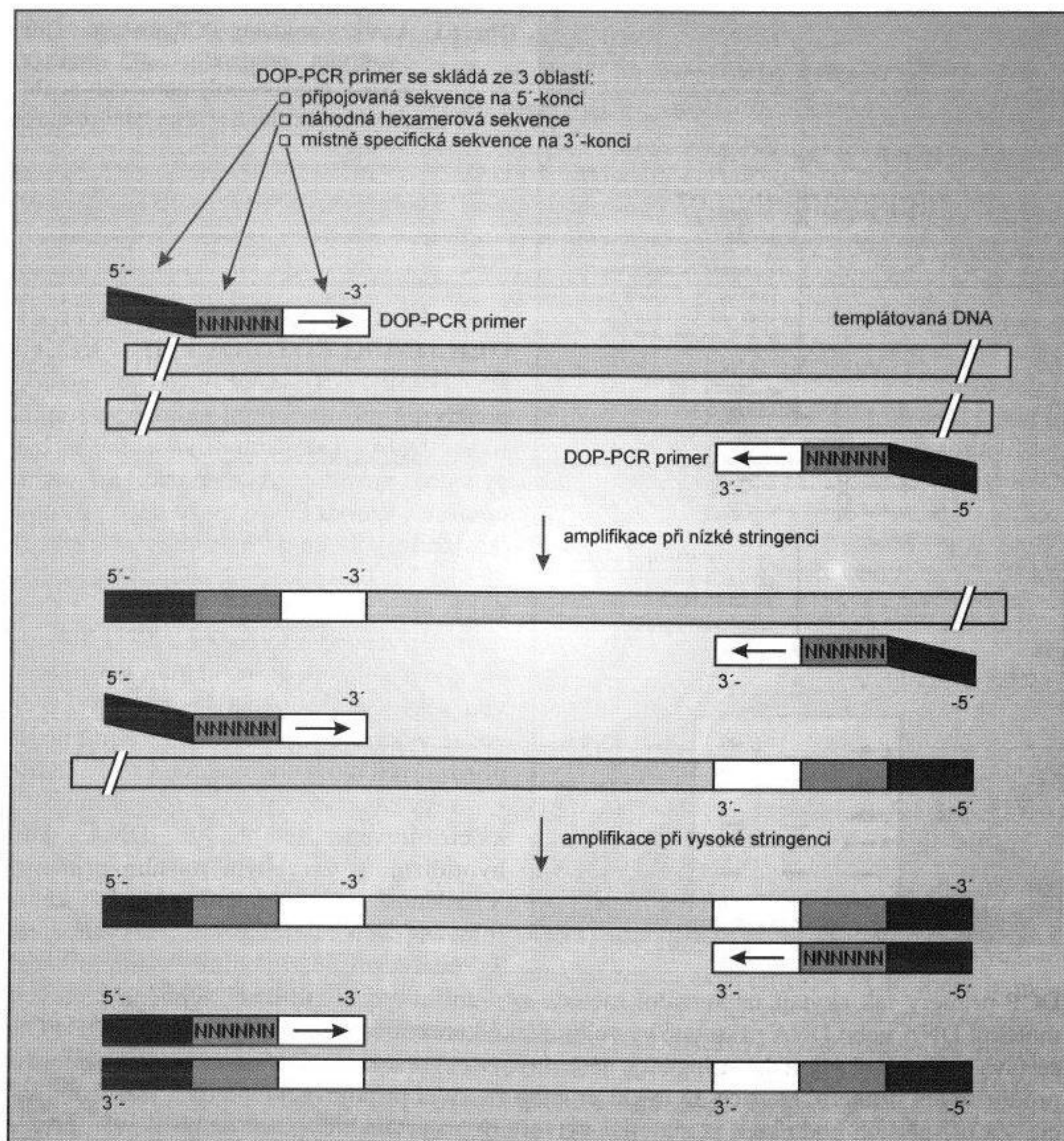
Obr. 63 Analýza produktu PCR metodou DdF s vnitřním primerem; „a“ označuje složku dideoxy-polymorfizmu a „b“ označuje složku SSCP-polymorfizmu

PCR S DEGENEROVANÝMI OLIGONUKLEOTIDOVÝMI PRIMERY (DOP-PCR). DOP-PCR je metoda používaná pro uniformní náhodnou amplifikaci DNA. Tato amplifikace může být výhodná pokud je k dispozici jen malé množství vzorku DNA, takže další postupy (klonování, značení, hybridizační reakce) mohou být provedeny účinněji. **Degenerované oligonukleotidové primery (DOP)** mají definované sekvence na 5'- a 3'-koncích, které ohraničují náhodnou hexamerovou sekvenci. Náhodná hexamerová sekvence vykazuje všechny možné kombinace přirozených nukleotidů: A, G, C a T. DOP-primery se připojují při nízké stringenci k denaturované templátové DNA, kde hybridizují k vazebným místům primeru. Vzdálenost vazby primerů může být kontrolována délkou definované sekvence na 3'-konci a přísností podmínek amplifikace.

DOP-primery tak skýtají univerzální metodu pro uniformní amplifikaci zejména krátkých molekul DNA nebo DNA přítomné ve velmi nízké koncentraci. Prvních pět cyklů DOP-PCR sestává z připojení při nízké stringenci, následným zvyšováním teploty na elongační teplotu a prodlužování primeru. Dalších 35 cyklů probíhá za vyšší připojovací teploty (vyšší stringenci). Za přísnějších podmínek je materiál vytvořený při prvních cyklech amplifikován preferenčně, protože obsahuje kompletní primerovou sekvenci na obou koncích (obr. 64). Na jiných místech se DOP-primer při stringentních podmínkách neváže. Amplifikace DOP-PCR vede ke vzniku spektra různě dlouhých fragmentů DNA.

DOP-PCR se uplatňuje při:

- hybridizaci *in situ* s chromozomy separovanými metodou FACS, chromozomy po mikro-sekci nebo genomovou DNA z hybridních somatických buněk,
- srovnávací genomové hybridizaci (CGH),
- přípravě fragmentů DNA frakcionovaných podle velikosti,
- analýzu nebo klonování stopových množství DNA nebo DNA z nekultivovatelných mikroorganismů.



Obr. 64 Princip uniformní amplifikace DNA s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR)

DEGENEROVANÁ PCR (D-PCR). Degenerovaná PCR se používá pro získání původních sekvencí cDNA na základě omezených informací o sekvenci aminokyselin. Pokud není známo, která z variant sekvence DNA se může v genomu vyskytovat, jsou PCR-primery odvozeny ze zpětné translace proteinového motivu, zpravidla 6 až 9 aminokyselinových kodonů, jejímž výsledkem je směs **primerů s různým stupněm degenerace** s výjimkou kodonů pro metionin a tryptofan (obr. 65). Návrhu primerů musí být věnována velká pozornost vzhledem k možnosti zvýšení komplexity sekvencí primeru, která zpravidla vede k získání nespecifických produktů. Jakmile je vybrána optimální sekvence primeru, může být syntetizována současně směs všech variant sekvence reprezentující všechny možné aminokyselinové kombinace degenerované sekvence. Degenerace je zajištěna při syntéze primeru a

není nutné syntetizovat zvláště všechny varianty. Degenerovaná PCR je úspěšně používána pro:

- vyhledání sekvence DNA na základě sekvence aminokyselin stanovené u proteinu,
- vyhledání a klonování homologických genů např. člověka a myši,
- hledání a studium genových rodin s určitou strukturní podobností,
- fylogenetické a evoluční studie využívající srovnávání ortologních genů.

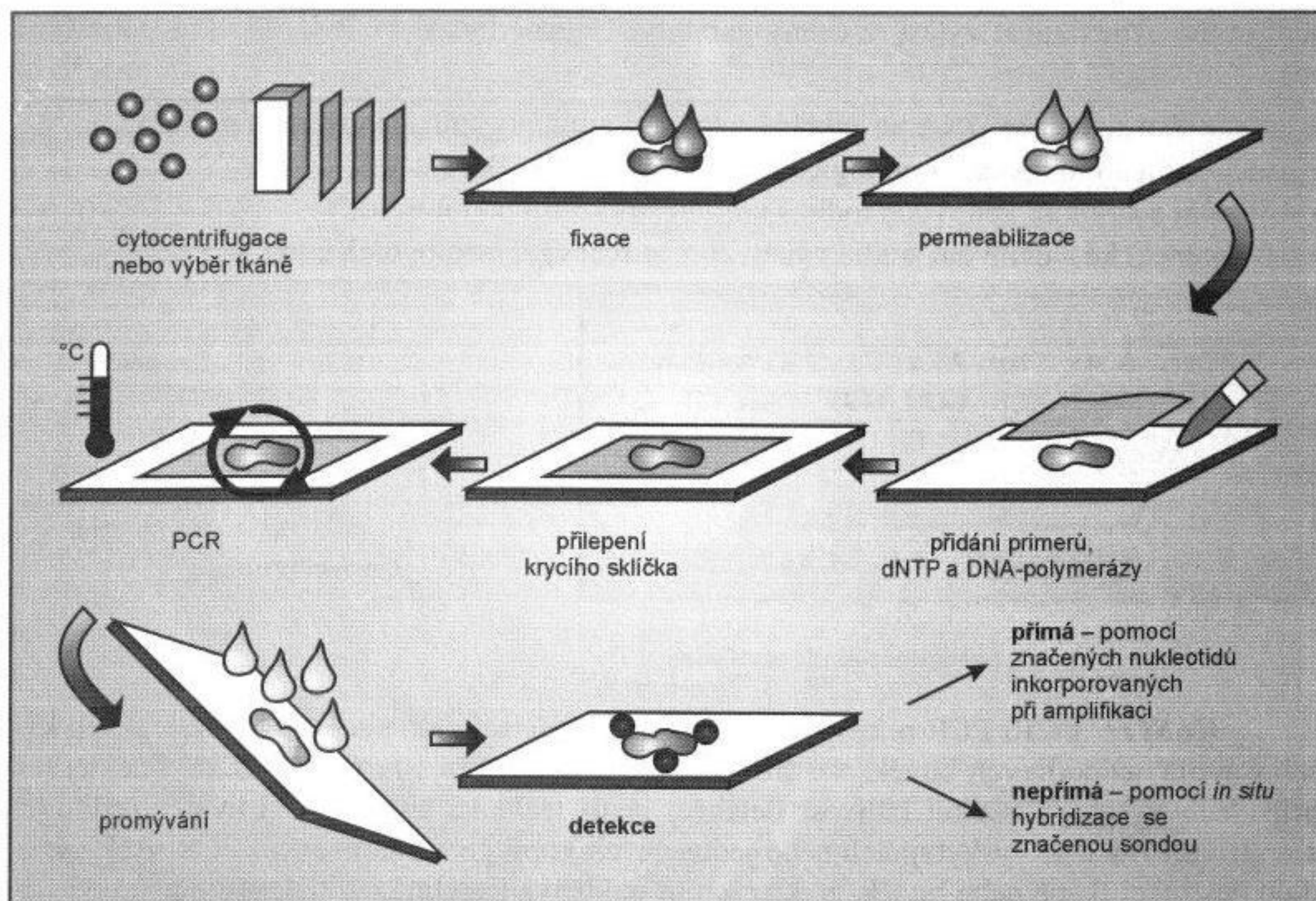
	Trp	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	
5'	TGG	GAY	ACN	GCN	GGN	CAR	GA	3'
		T	G	G	G	G		
		C	A	A	A	A		
			T	T	T			
			C	C	C			

Obr. 65 256 variant degenerovaného primeru odvozeného zpětnou translací proteinu

IN SITU PCR. PCR může být využita pro lokalizaci určité sekvence nukleových kyselin uvnitř jednotlivých buněk. Ve srovnání s hybridizací *in situ* (ISH), která v některých případech vykazuje nízkou citlivost detekce, je to technika extrémně citlivá, umožňující amplifikaci řídce se vyskytujících nebo jedinečných kopií genů. Konvenční PCR však vyžaduje destrukci tkáně nebo buněk, ze kterých se nukleová kyselina izoluje, proto nelze výsledek amplifikace asociovat se specifickým histologickým typem buněk, s histopatologickými rysy nebo mírou či procentem buněk, obsahujících cílovou sekvenci. *In situ* PCR je technika, která kombinuje vysokou citlivost PCR s cytologickou lokalizací sekvencí poskytnutou ISH. Kombinace těchto technik bývá také nazývána PCR-ISH, vnitrobuněčná PCR nebo PCR řízená ISH. Principem *in situ* PCR je amplifikace specifické sekvence DNA v buňce, čímž se počet kopií zvýší natolik, že je lze detekovat snadno metodou ISH nebo imunochemicky.

Postup zahrnuje fixaci buněk nebo tkáně při zachování jejich morfologie, permeabilizaci umožňující přístup primerů a dalších reagensů k intracelulárním sekvencím nukleových kyselin a amplifikaci *in situ* PCR uvnitř neporušených buněk udržovaných v suspenzi a nebo v řezech tkání pod mikroskopickým sklem. *In situ* PCR v buněčných suspenzích se provádí s fixovanými buňkami resuspendovanými v reakční směsi pro PCR v mikrozkuhavce v konvenčním termocykleru. V preparátech jednotlivých buněk jsou nukleové kyseliny lépe chráněny a fixované buňky fungují jako amplifikační váčky se semipermeabilní membránou která dovoluje průchod primerů, nukleotidů a DNA-polymerázy do jádra, a přitom dostatečně zadržuje produkty, brání jejich zpětné difúzi a dovoluje detekci produktů PCR *in situ*. Po dokončení PCR se buňky centrifugují a alikvotní část je lyzována a analyzována gelovou elektroforézou a Southernovou hybridizací. Zbývající buňky jsou cytocentrifugovány na podložní sklička. Následná vizualizace intracelulárních produktů PCR se provádí pomocí ISH nebo imunochemicky.

Pro *in situ* PCR prováděné přímo v řezech tkání na podložních sklíčkách, je buněčný materiál přelit směsí PCR pod krycím sklíčkem, které je pak utěsněno gumovým cementem, lakem nebo překryto minerálním olejem, aby nedocházelo k nežádoucímu odpařování (obr. 66). Cyklické střídání teplot je dosaženo položením sklíčka např. na blok termocykleru. Ve srovnání s tradiční PCR má *in situ* PCR velmi nízkou účinnost, amplifikací v suspendovaných buňkách se dosáhne asi 50násobku množství DNA po 30 cyklech a u preparátů na sklíčkách je toto množství ještě nižší. Pro detekci intracelulárních produktů se používají dvě zcela odlišné metody:



Obr. 66 Postup jednotlivých kroků při PCR *in situ*

- *in situ* hybridizace se značenou sondou (nepřímá *in situ* PCR),
- přímá detekce značených nukleotidů (digoxigenin-11-dUTP, fluorescein-12-dUTP, tetrametyl rhodamin-5-dUTP, ^3H -CTP), které byly inkorporovány do PCR produktů během amplifikace (přímá *in situ* PCR).

Nepřímá metoda skýtá maximální specifitu při detekci intracelulárních produktů PCR. Přímá *in situ* PCR je rychlejší alternativou bez následné ISH. Vzhledem k její jednoduchosti se nyní používá častěji, ale i přes zlepšení ve fixaci, permeabilizaci a modifikaci s horkým startem, dává přímá metoda méně produktu než nepřímá, zvláště v řezech tkání. Příbuzná metoda využívaná v cytogenetických aplikacích je označována jako **primerem zprostředkované značení *in situ*** (PRINS).

In situ PCR má uplatnění jak ve výzkumu, tak v diagnostice:

- pro analýzu chromozomových přeskupení a translokací,
- pro vyhledávání jednokopiových genů a mapování nízkokopiových chromozomových sekvencí v metafázických chromozomech,
- pro detekci nízkokopiových mRNA,
- pro detekci sekvencí virových nebo provirových genomových nukleových kyselin (HIV-1, MMTV, CMV, HBV, HSV-2) a virových mRNA.

AMPLIFIKACE VNITŘNÍCH PŘEPISOVANÝCH MEZERNÍKŮ (ITS-PCR).

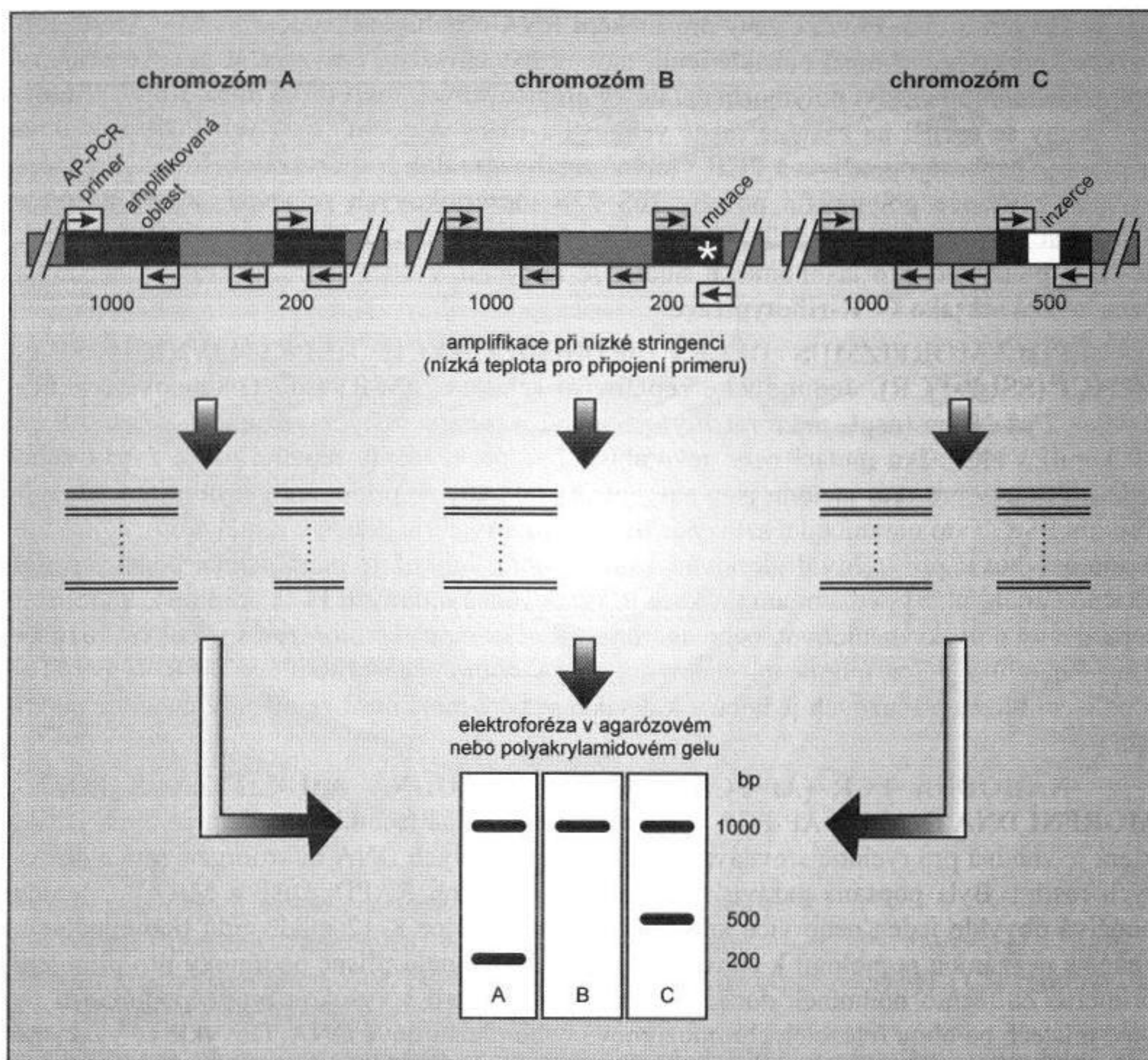
Vnitřní prepisované mezerníky (ITS) se nacházejí uvnitř transkripčních jednotek mezi geny pro funkční molekuly RNA (rRNA nebo tRNA) a jejich transkripty se v rámci posttranskripčních úprav vyštěpují za tvorby funkčních rRNA z pre-rRNA nebo tRNA z pre-tRNA. Polymorfismus délky ITS se využívá v diagnostice prokaryotických organismů a vychází z rozdílných vzdáleností mezi opakujícími se konzervovanými geny pro rRNA nebo tRNA

u jednotlivých druhů. Protože geny pro funkční RNA obsahují sekvenční motivy, které jsou vysoce konzervativní mezi eubaktériemi, mohou být navrženy univerzální genové primery k prozkoumání množství polymorfismu délky přepisovaných mezerníků mezi druhy. Jednotlivé druhy se rozliší na základě různé velikosti a různého počtu vzniklých PCR-produktů. V praxi je nejčastěji používána **PCR vnitřních ribozomálních mezerníků (RS-PCR)**, která vychází z vysoce polymorfni povahy 16S–23S mezerníkových sekvencí. RS-PCR může detekovat významný stupeň délkových a sekvenčních polymorfismů na úrovni rodu i druhu a je často používána pro taxonomické studie. Je to rychlá vysoce reprodukovatelná technika označovaná též jako **PCR-ribotypizace**.

POLYMORFIZMUS DÉLKY JEDNODUCHÝCH REPETITIVNÍCH SEKVENCÍ (SSLP-PCR). Jednoduché repetitivní sekvence (SSR) jsou tandemové repeticie o délce 2 až 10 bp (např. mikrosatelity) přítomné v eukaryotických genomech s četností až 80 kopií. V důsledku mutací nebo rekombinací se počet těchto repeticí může zvýšit nebo snížit. Primery pro tuto metodu jsou navrhovány tak, aby se připojovaly k 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 polyakrylamidovou nebo agarózovou gelovou elektroforézou 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.

NÁHODNÁ PCR (AP-PCR) NEBO NÁHODNÁ AMPLIFIKACE POLYMORFNÍ DNA (RAPD). AP-PCR je rychlá a jednoduchá technika pro fingerprintink DNA, která je vhodná pro rychlou srovnávací typizaci genomových DNA mikroorganismů a některých rostlin. Byla popsána nezávisle také pod označeními RAPD, DAF a MAAP. Metoda používá obvykle jeden nebo více krátkých primerů o délce 8–12 nukleotidů libovolné sekvence s neznámou homologií k cílové sekvenci DNA a málo přísné podmínky pro připojení primeru. Za těchto podmínek dochází k nasedání primeru s vysokou pravděpodobností na více místech na obou řetězcích chromozomové nebo plazmidové DNA. Obvykle se vyskytne několik míst, která nejsou od sebe příliš vzdálená a umožňují připojení primerů na protilehlých řetězcích 3'-konci směřujícími k sobě (obr. 67). Výsledkem je amplifikace mnoha fragmentů s různou délkou (max. 2 000 bp) a rozdílným molárním množstvím, v závislosti na izolátu, ze kterého genomová DNA pochází. Použitelnost oligonukleotidových primerů může být zhodnocena pouze empiricky a informace o sekvenci templátové DNA není nezbytná. Rozlišování vzorků dobře koreluje s jinými genotypizačními technikami. Přes svou vysokou účinnost jsou při AP-PCR problémy s reprodukovatelností a s nedostatkem shodných pravidel pro interpretaci rozdílů vzorů. Metoda se v praxi používá pro identifikační postupy a taxonomické studie a může být kombinována s analýzou DGGE nebo SSCP.

Produkty AP-PCR se využívají pro přípravu hybridizačních sond pro **binární typizaci** mikroorganismů. Při této metodě se genomová DNA podrobí hybridizaci se sérií sond, které jsou připraveny z jedinečných amplifikačních produktů AP-PCR, které diferencují bakteriální kmeny. Postup binární typizace byl technicky zjednodušen a zrychlen zavedením zpětné tečkové hybridizace s imobilizovanými sondami. Hybridizace se sondou je zaznamenána hodnotou 1, žádná hybridizace hodnotou 0. Binární kód je převeden do desítkové soustavy, toto číslo vyjadřuje binární typ. Tento genotypizační systém poskytuje jednoznačné, číselné popisy vzorků.



Obr. 67 Náhodně amplifikovaná chromozomová DNA metodou AP-PCR

INTERREPETITIVNÍ PCR (REP-PCR). Interrepetitivní (repetitivní) PCR je typičtější technika pro analýzu celého genomu využívající přítomnosti repetitivních elementů v bakteriálních nebo eukaryotických genomech. Princip metody je podobný AP-PCR, avšak pro zahájení amplifikace využívá známé repetitivní sekvence, vyskytující se v genomu ve více kopiích (repetice, IS elementy, transpozony, VNTR, nepřepisované mezerníky). Výsledkem amplifikace je více produktů různé velikosti, jejichž tvorba vychází z rozdílné lokality opakujících se elementů a z rozdílné vzdálenosti, která je odděluje v jednotlivých genomech, a poskytuje tak jedinečný fingerprint. Ačkoli jsou amplifikovány pouze malé části chromozomu, pro získání fingerprintu je třeba kompletní chromozomová DNA podobně jako u AP-PCR. Primery jsou navrhovány tak, aby se připojovaly přímo ke koncovým, konzervativním oblastem repeticí a 3'-konce primeru směřovaly směrem ven z repetitivního elementu tak, aby se neamplifikovala samotná repetice. K amplifikaci dojde pouze v tom případě, že sekvence se nacházejí v genomu v obrácené orientaci a amplifikovatelné vzdálenosti. Při návrhu univerzálních primerů použitelných pro více genomů je třeba navrhnout konsenzní sekvenci primeru a zvolit nižší teplotu pro jeho připojení.

K nejčastěji používaným repetitivním elementům používaným při interrepetitivní PCR u prokaryot pro účely genotypizace náleží:

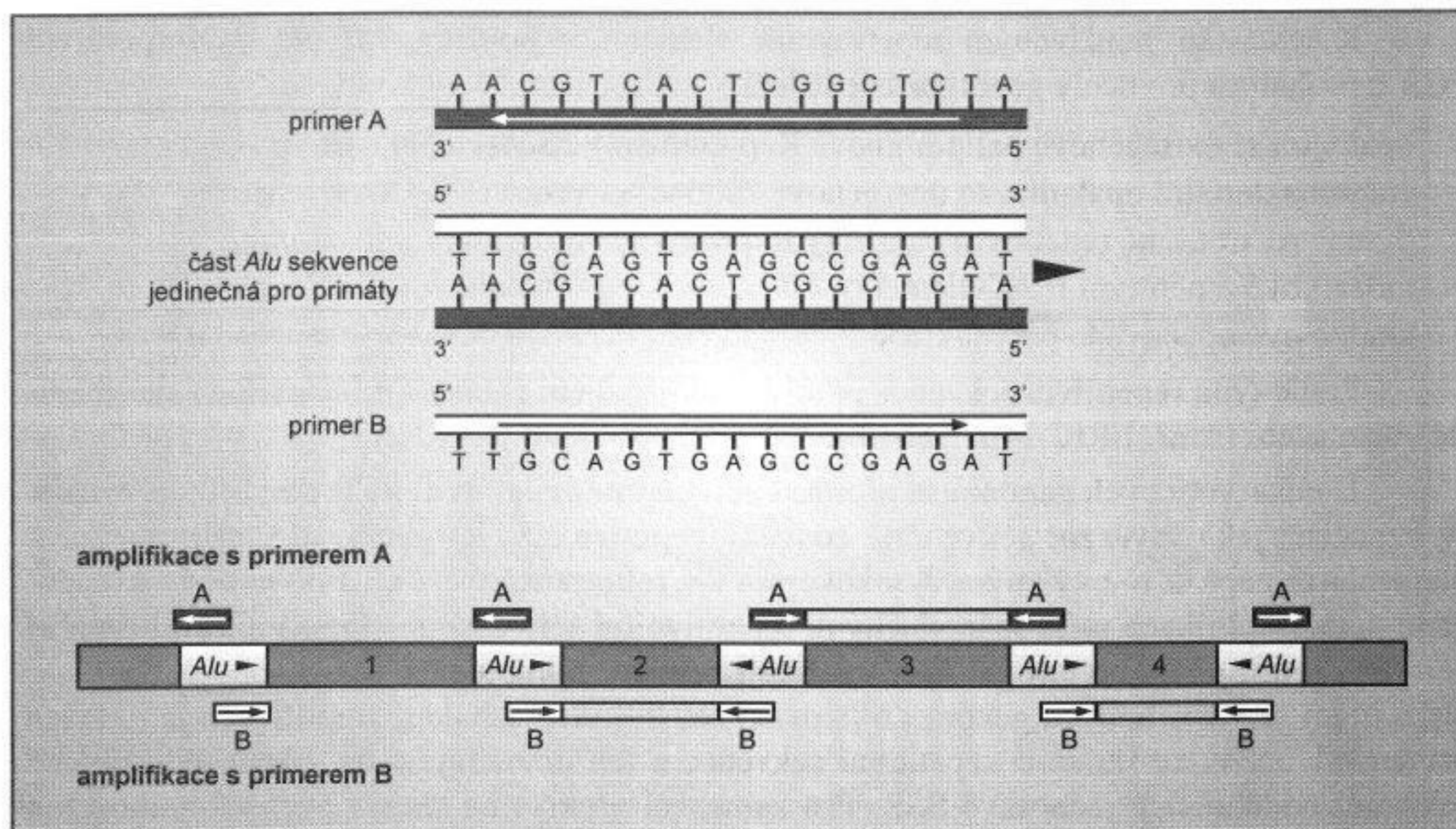
- opakující se extragenové palindromové Rep-elementy *Escherichia coli*,
- enterobakteriální opakující se intergenové shodné sekvence (ERIC-sekvence),
- dlouhé roztroušené repetitivní elementy RepMP3 z *Mycoplasma pneumoniae*,
- mozaikové repetitivní BOX-elementy z *Streptococcus pneumoniae*,
- tandemově opakované polynukleotidové sekvence (GTG)_n popsané u enterobakterií.

Podle typu repetitivní sekvence použité pro připojení primerů mívá metoda své specifické označení (např. ERIC-PCR nebo BOX-PCR).

U eukaryotických genomů se prostřednictvím interrepetitivní PCR amplifikují markery označené jako **inverzní sekvenčně značené repetice (ISTR)** používající primery komplementární např. k rozptýleným vysokokopiovým retrotranspozonům. Jiné metody označované jako amplifikace mezi jednoduchými repetitivními sekvencemi (ISSR) a **amplifikační reakce s jedním primerem (SPAR)** využívají primery homologické k sekvencím SSR nacházejícím se v rostlinných genomech (srovnej str. 99). Pro zahájení amplifikace je navržen primer odvozený ze samotné repetitivní sekvence a ten umožňuje amplifikaci jedinečných sekvencí oddělujících jednotlivé SSR. Pro zamezení překrývání těchto primerů mohou být prodlouženy o jedinečnou genomovou sekvenci ohraničující repetici. Primery navržené z tetranukleotidových repeticí, např. (GATA)₄, dávají lepší výsledky než dinukleotidové nebo trinukleotidové.

Určitým vylepšením metody interrepetitivní PCR je **fluoroforem zdokonalená interrepetitivní PCR (FERP)**, která používá primerů značených na 5'-konci fluorescenční látkou, rozdělení produktů PCR v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu a digitální zpracování otisků DNA. Další obměnou je **automatická laserová fluorescenční analýza (ALFA)**, při které se rovněž používají 5'-koncově fluorescenčně značené PCR-primery a produkty PCR jsou rozděleny v denaturujícím polyakrylamidovém gelu na automatizovaném sekvenátoru, což značně zlepšuje rozlišení a reprodukovatelnost.

Do skupiny interrepetitivní PCR bychom mohli zařadit i variantu označovanou **Alu-PCR**, která je používána k amplifikaci sekvencí DNA specifických pro člověka. **Alu-PCR** představuje velmi jednoduchý prostředek pro charakterizaci a amplifikaci specificky lidské DNA. Metoda používá primery pro repetitivní sekvence, které jsou přítomny v množství asi 900 000 kopií v lidském genomu. **Alu**-sekvence o délce 300 bp je velmi variabilní a obsahuje sekvenci, která je specifická pro člověka. Pro amplifikaci se připraví dva primery, každý pro jeden směr, přičemž se využije nejvíce konzervativních úseků těchto sekvencí (obr. 68). Primery nelze použít společně, neboť vzájemně hybridizují. Lidské sekvence se budou amplifikovat, pokud leží mezi sousedními **Alu**-repeticemi, které jsou orientovány v opačných směrech. Tato technika je často používána pro odlišení lidské DNA od ostatních DNA.



Obr. 68 Princip amplifikace mezerníkových sekvencí mezi *Alu*-repeticemi metodou *Alu*-PCR

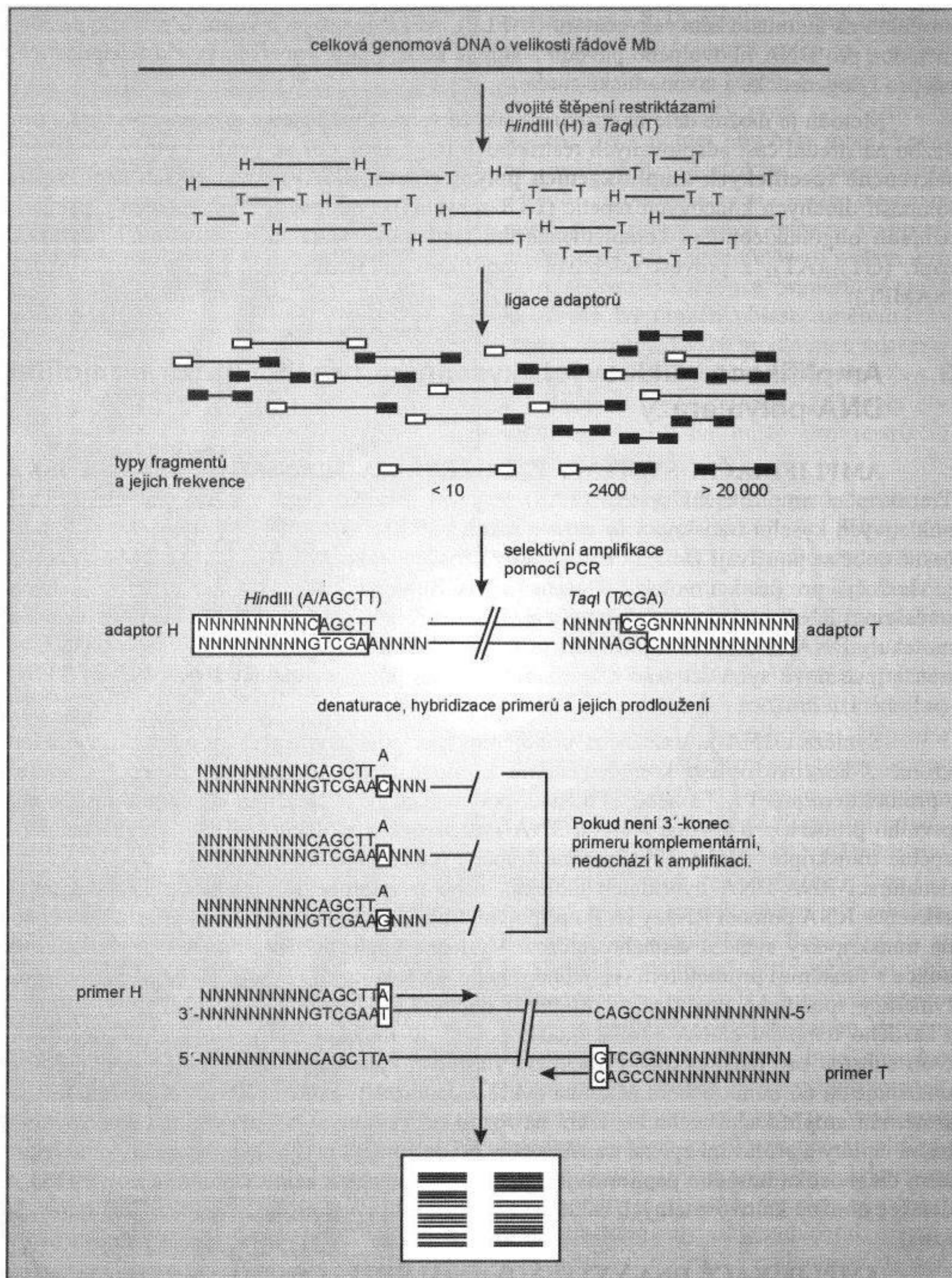
POLYMORFIZMUS DÉLKY AMPLIFIKOVANÝCH FRAGMENTŮ (AFLP).

AFLP představuje novátorskou metodu pro charakterizaci celkové genomové DNA, která poskytuje vysoké rozlišení a dobrou reprodukovatelnost. Označuje se rovněž jako **amplifikace vzácných restrikčních míst (IRS-PCR)** nebo **selektivní amplifikace restrikčních fragmentů DNA podmíněná primerem (SRFA)**. Metoda zahrnuje čtyři základní kroky (obr. 69):

- úplné rozštěpení extrémně malého množství genomové DNA jednou nebo dvěma restrikčními endonukleázami, z nichž jedna mívá zpravidla méně cílových míst,
- ligaci genomové DNA s oligonukleotidovými adaptory, které jsou navrženy tak, aby nedocházelo k obnově restrikčního místa; ligace probíhá za přítomnosti restriktáz, takže nedochází ke spojování restrikčních fragmentů,
- selektivní amplifikaci sady restrikčních fragmentů pomocí jednoho nebo dvou selektivních AFLP-primerů,
- gelovou elektroforézou amplifikovaných fragmentů v nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu.

Použitím AFLP je tedy možno vizualizovat sadu restrikčních fragmentů pomocí PCR bez znalosti jejich nukleotidové sekvence. Amplifikace restrikčních fragmentů je dosaženo použitím sekvencí adaptoru a zbytku restrikčního místa, které slouží jako cílová místa pro připojení primerů. Aby bylo dosaženo amplifikace pouze části adaptovaných fragmentů, bývají AFLP-primery navrženy tak, že jsou delší o jednu až tři náhodně zvolené báze na 3'-konci směrem k neznámé sekvenci fragmentu bezprostředně sousedící s restrikčním místem. K amplifikaci a prodloužení primeru dochází pouze v případě komplementárního párování 3'-konce AFLP-primeru. Tímto způsobem dochází k selektivnímu výběru pouze malé části z velkého počtu až desetitisíců fragmentů vytvořených štěpením genomové DNA, takže výsledný fingerprint lze snadno vyhodnotit a reprodukovat. Polymorfismus je založen na ztrátě nebo získání restrikčních míst a je analogický s polymorfismem RFLP. Zdokonalením metody je použití fluorescenčního značení u jednoho z primerů a separace vzniklých

AMPLIFIKACE NUKLEOVÝCH KYSELIN



Obr. 69 Postup stanovení polymorfizmu délky amplifikovaných fragmentů metodou AFLP

produktů na automatickém sekvenátoru (fAFLP). AFLP je novou a velmi účinnou typizační metodou pro DNA libovolného původu a stupně komplexity, využívanou jak v diagnostice, tak pro fylogenetické a taxonomické studie.

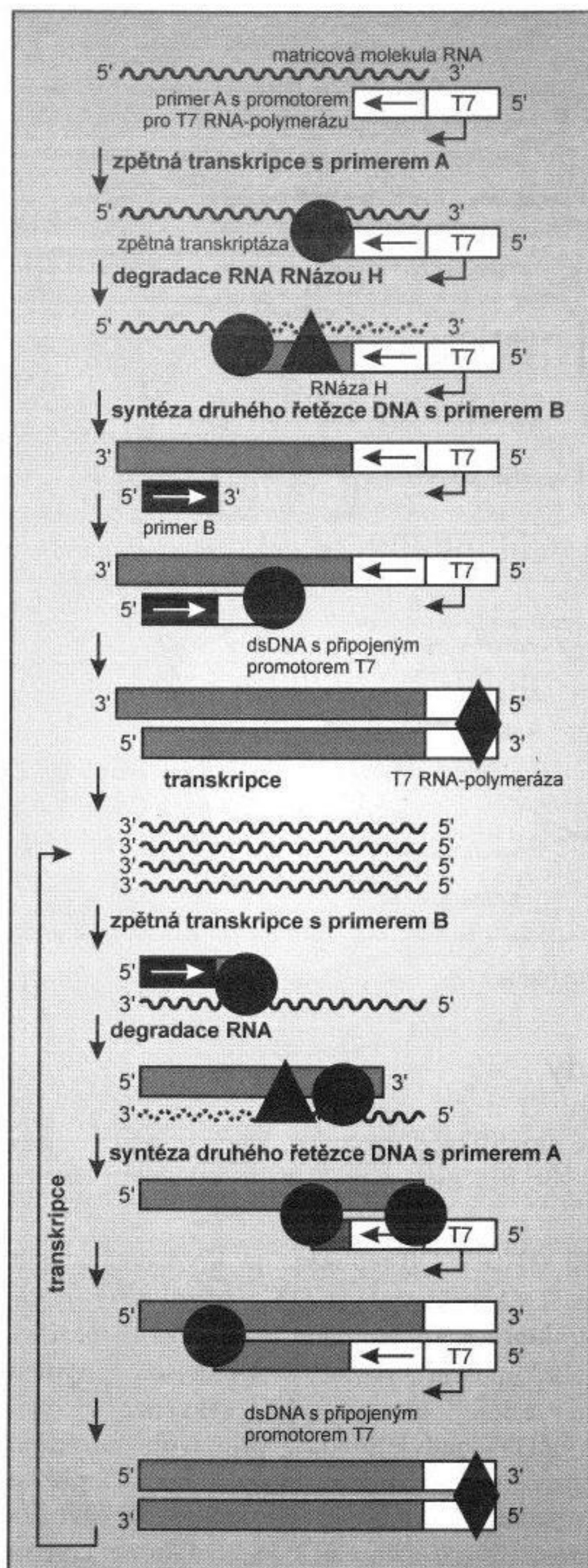
Metodu je možné dále modifikovat tak, že se navrhne jeden z primerů specificky pro vazbu na střední část adaptovaných restričních fragmentů, což se využívá pro vyhledávání **sekvenčně specifických amplifikačních polymorfizmů (SSAP)** souvisejících např. s přítomností dlouhých koncových repetitiv (LTR-sekvencí). Podobně je možné jeden z primerů nahradit oligonukleotidem komplementárním tandemové jednoduché repetitivní sekvenci, např. (GT)₇₂(AT)₂ a provést selektivní amplifikaci mikrosatelitních polymorfních lokusů (SAMPL).

3. Amplifikace nukleových kyselin za nepřítomnosti termofilní DNA-polymerázy

AMPLIFIKAČNÍ SYSTÉMY ZALOŽENÉ NA TRANSKRIPCI (TAS A 3SR). Transkripční amplifikační systém (TAS) je první metoda, která využívá pro amplifikaci nukleových kyselin transkripci *in vitro* a nikoli replikaci s *Taq* DNA-polymerázou. V současné době se používají varianty této metody označené jako 3SR (NASBA) a TMA. Metoda je vhodnější pro detekci molekul RNA než DNA. Strategii 3SR je kontinuální série zpětných transkripcí RNA následovaných transkripcí DNA. Každý cyklus 3SR se skládá ze syntézy molekuly DNA, která je komplementární k cílové nukleové kyselině (RNA nebo ssDNA) a transkripce nově syntetizované cDNA, která slouží jako intermediát a templát pro RNA-polymerázu *in vitro*.

Syntéza cDNA je umožněna připojením speciálně navržených primerů obsahujících kromě 3'-koncové oblasti komplementární k cílové DNA přídatnou 5'-sekvenci adaptoru s promotorem pro T7, T3 nebo SP6 RNA-polymerázu. V počátečním kroku je po připojení prvního primeru pro každou cílovou RNA syntetizována molekula ssDNA prostřednictvím zpětné transkriptázy (obr. 70). Syntéza druhého řetězce vyžaduje u varianty TAS tepelnou denaturaci RNA-DNA hybridních molekul, nebo u varianty 3SR enzymatické odstranění sekvence RNA pomocí RNázy H. Po připojení druhého primeru probíhá za přítomnosti zpětné transkriptázy syntéza druhého řetězce. Výsledná kopie dsDNA obsahuje modifikované konce s funkčním promotorem (na jednom nebo obou koncích cDNA). Po přidání RNA-polymerázy specifické pro fágový promotor dochází k vlastnímu amplifikačnímu kroku a z každého templátu cDNA vzniká transkripcí až 40 molekul RNA. Nové molekuly RNA tvoří substrát pro další cyklus. Přitažlivou vlastností systému je jeho rychlá kinetika, která umožňuje za 60 minut během několika cyklů získat až 10⁷ molekul RNA. Variantou 3SR je izotermní amplifikační technika, která na rozdíl od varianty TAS nevyžaduje změny inkubační teploty a přidávání zpětné transkriptázy při dalším cyklu. Příkladem využití je molekulární diagnostika lidského papilomaviru, detekce rezistence k azidotymidinu u viru HIV-1 a detekce obtížně kultivovatelných bakterií (*Chlamydia trachomatis* a *Mycobacterium tuberculosis*).

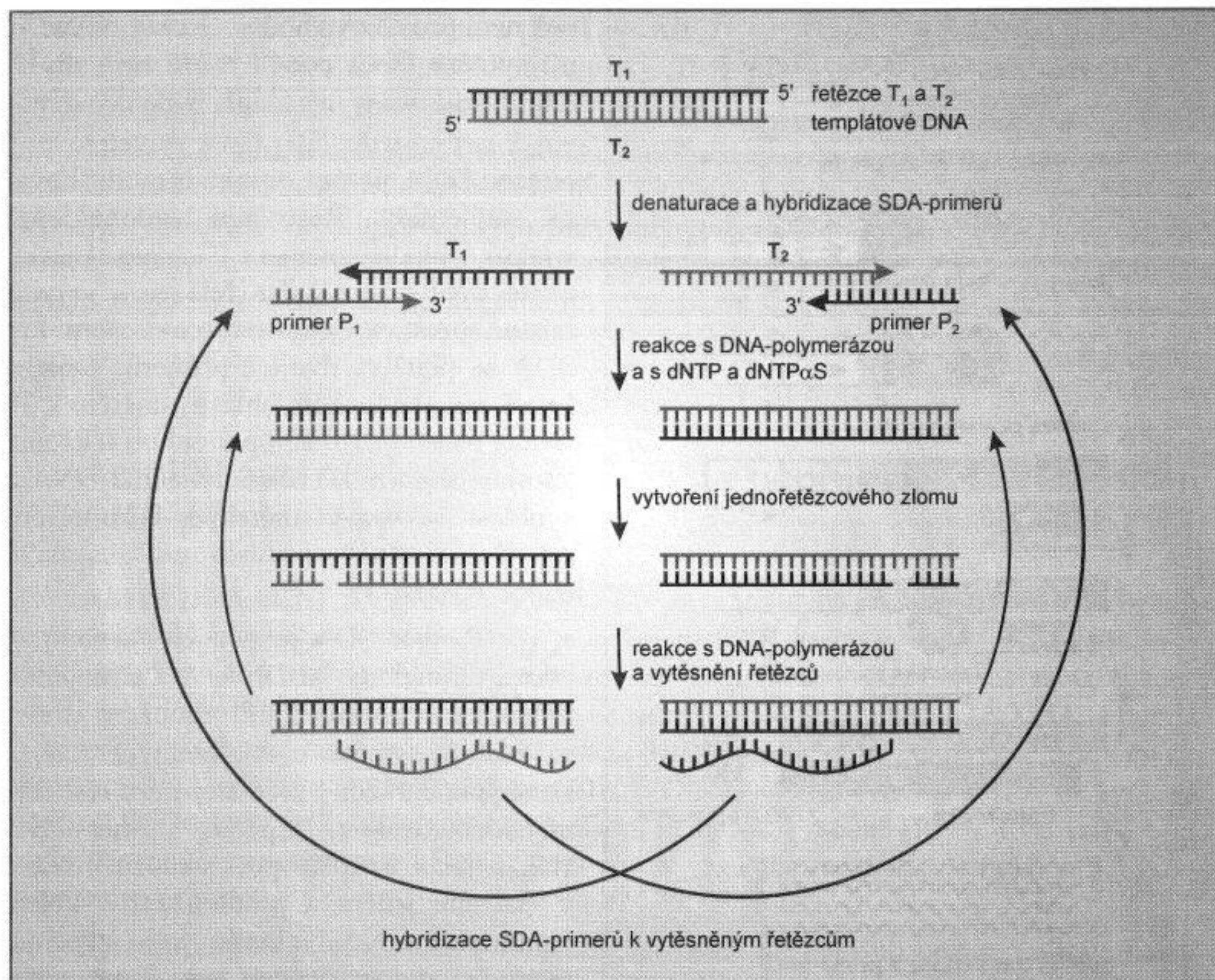
AMPLIFIKACE DNA VYTĚŠŇOVÁNÍM ŘETĚZCE (SDA). Metoda je založená na schopnosti DNA-polymerázy bez 3'- a 5'-exonukleázové aktivity iniciovat syntézu DNA v místě jednořetězcového zlomu uvnitř cílové molekuly a vytěšnit řetězec se zlomem během syntézy nového řetězce DNA. Takto vzniklé jednořetězce slouží jako substrát pro další SDA-reakci a izotermní akumulaci dvou- a jednořetězcových kopií cílové molekuly. Klíčem technologie SDA je vytvoření místně specifických jednořetězcových zlomů štěpením restriční endonukleázou. Za normálních podmínek restriční endonukleázy štěpí oba řetězce,



Obr. 70 Princip amplifikačního systému 3SR založeného na transkripci

což není pro SDA vhodné. Avšak pokud je při syntéze DNA použit jeden ze 4 dNTP α -thio-substituovaný (např. 2'-deoxyadenozin-5'- α -thio-trifosfát), nově syntetizovaný řetězec DNA potom obsahuje modifikované nukleotidy. Restrikční endonukleáza v takto modifikovaném rozpoznávacím místě štěpí pouze jeden řetězec a vytvoří místně specifický jednořetězcový zlom. Pro SDA se používá dvojice primerů, z nichž každý má dvě funkční oblasti: směrem k 3'-konci obsahují 15–20 bp dlouhou sekvenci komplementární k cílové molekule DNA a v oblasti sekvence směrem k 5'-konci obsahují rozpoznávací místo pro restrikční endonukleázu.

Reakce SDA je zahájena denaturací cílové molekuly dsDNA a připojením SDA-primerů (obr. 71). Prodloužení primerů vede k syntéze α -thiolovaných řetězců, které jsou chráněny před štěpením restrikční endonukleázou. Připojený primer navíc slouží jako templát pro syntézu řetězce v opačném směru a prodloužení 3'-konců templátové DNA. Jakmile jsou štěpením restrikční endonukleázou vytvořeny jednořetězcové zlomy, 3'-konec vytvořený v místě jednořetězcových zlomů inicializuje syntézu DNA a dojde k vytěsnění nových polynukleotidových řetězců. Oba vytěsněné řetězce se pak uplatní při zahájení dalšího cyklu amplifikace. Reakce SDA je izotermní a simultánní. Střídání teplot není nutné, protože řetězce DNA jsou denaturovány enzymaticky vytěsňováním řetězce DNA-polymerázou. Metoda byla původně vyvinuta pro detekci obtížně kultivovatelných mykobakterií, kde bylo po 5hodinové inkubaci získáno až 10^6 násobné amplifikace původních 100 kopií cílové sekvence. Nevýhodou je vysoká cenová náročnost (thio-substituovaný oligonukleotid) a nutnost používat restrikční endonukleázu, což znesnadňuje výběr cílových sekvencí. Budoucí modifikace SDA budou zahrnovat použití termofilní DNA-polymerázy a možná termofilní restriktazy, což přinese značné zvýšení analytické specifity reakce.

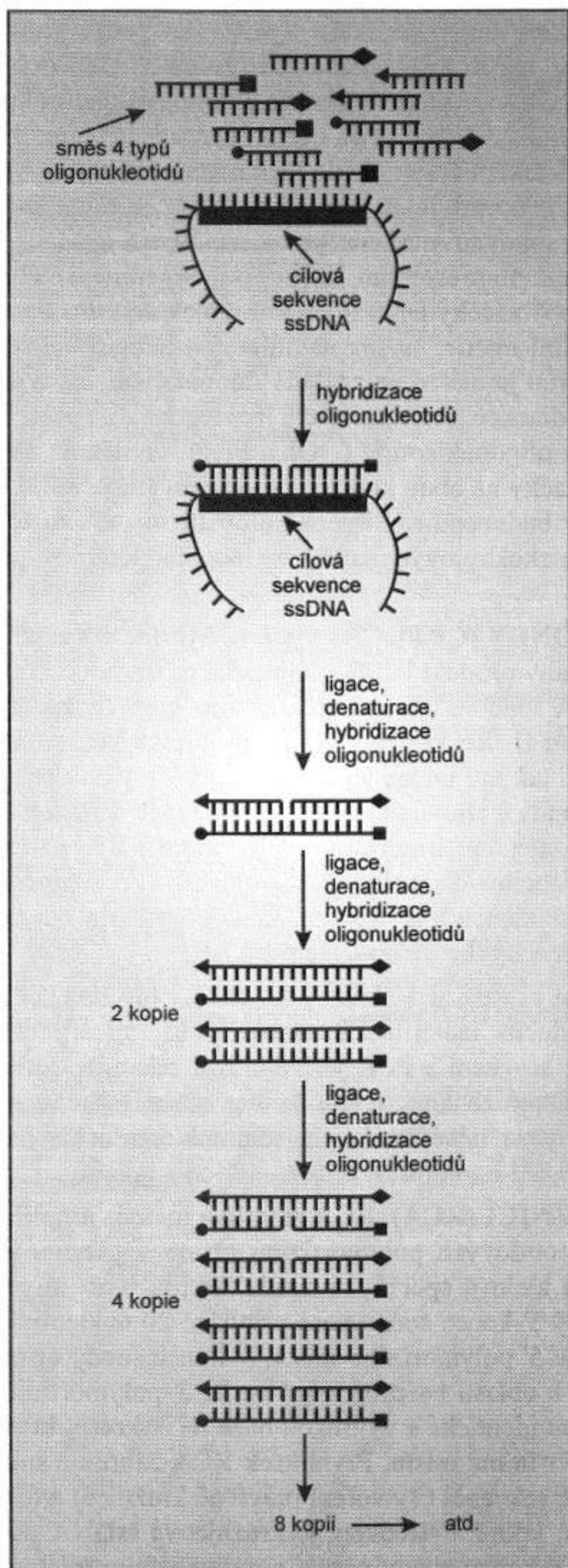


Obr. 71 Izotermní amplifikace DNA vytěsňováním řetězce

4. Metody pro amplifikaci sondy

Cílem metod pro amplifikaci sondy je amplifikace sekvence, která se použije jako sonda při hybridizaci a tak zajistí zesílení hybridizačních signálů nebo selektivní detekci amplifikovaných produktů PCR.

AMPLIFIKACE REPLIKÁZOU Q β (QBR). Q β -replikáza je RNA-dependentní RNA-polymeráza, která replikuje genomovou RNA bakteriofága Q β z čeledi *Leviviridae*. Enzym rozpoznává specifickou sekundární strukturu RNA tvořenou intramolekulárním párováním bází genomové RNA fága Q β . Jiné sekundární struktury RNA nejsou enzymem rozpoznávány. Některé substráty Q β -replikázy tolerují vložení krátké sekvence sondy a označují se jako „uprostřed obměněné sondy“ (MDV-sondy). Sonda se připravuje transkripcí *in vitro*. Pro konstrukci sondy, která je schopná replikace se využívá predikce sekundární struktury RNA podobné standardní struktuře v genomu bakteriofága. Kromě rozpoznávacího místa pro Q β -replikázu nese sonda navíc ve smyčce s vlásenkou na 3'- nebo 5'-konci krátkou sekvenci specifickou pro cílovou molekulu. Po provedení hybridizace sondy s cílovou DNA se volná sonda odstraní RNázou III. U navázané sondy chybí rozpoznávací místo pro RNázu III v důsledku změny sekundární struktury po vazbě na cíl a proto není degradována. Aby se snížila možnost nesespecifické vazby sondy, je možné využít variantu metody QBR, která využívá ligaci dvou sousedících binárních sond. Plně amplifikovatelný substrát rozpoznávaný



Obr. 72 Ligázová řetězová reakce (LCR)

Q β -replikázou se tvoří až po ligaci, která proběhla po specifické vazbě obou sond na cílovou sekvenci. Po přidání Q β -replikázy do reakce jsou amplifikovány nově syntetizované molekuly sondy původně hybridizující na cílovou sekvenci. QBR vykazuje podobně jako 3SR velmi rychlou kinetiku a tvoří až 10^9 molekul za 30 min. Metoda se používá za účelem zesílení hybridizačních signálů při detekci obtížně kultivovatelných mikroorganismů a byla úspěšně použita při kvantifikaci molekul RNA HIV-1.

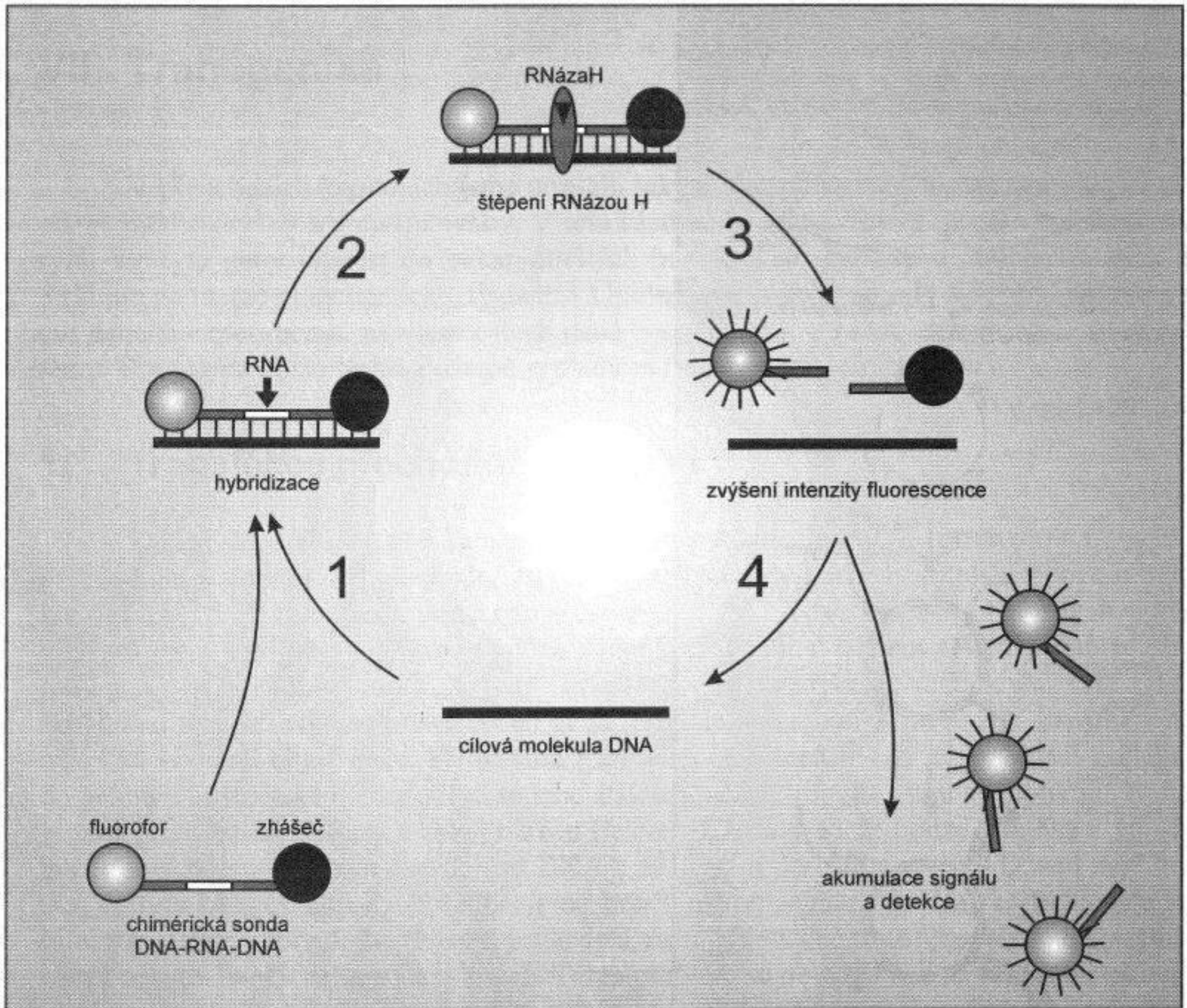
LIGÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (LCR). LCR je alternativní metoda amplifikace sondy založená na ligaci oligonukleotidových sond v závislosti na jejich vazbě na cílovou DNA. Metoda probíhá v opakovaných cyklech zahrnujících denaturaci DNA, hybridizaci sond a ligaci. LCR vyžaduje čtyři oligonukleotidy (LCR-primery): dva sousední, které specificky hybridizují k jednomu řetězci cílové DNA a další, komplementární dvojici sousedních oligonukleotidů, které hybridizují k protilehlému řetězci (obr. 72). K ligaci párů komplementárních oligonukleotidových sond po jejich připojení na cílovou sekvenci metoda využívá termostabilní DNA-ligázu z *Thermus aquaticus*, která si udržuje aktivitu i po mnoha cyklech denaturace. Oligonukleotidy musí obsahovat 5'-koncovou fosfátovou skupinu, aby DNA-ligáza mohla připojit 3'-OH skupinu sousedního primeru. Úspěšná ligace proběhne pouze při dokonalém párování 3'- a 5'-konců obou sousedících oligonukleotidových sond k cílové molekule. Po dokončení první úspěšné ligace vzniká produkt, který napodobuje původní molekulu a slouží jako templát pro připojení zbývajících dvojic oligonukleotidů a jejich ligaci. Úspěšná ligace následně vede k exponenciální amplifikaci sondy. LCR je velice vhodná pro detekci jednonukleotidových polymorfizmů, protože chybné párování jen jedné báze na 3'-konci sondy vázající se po směru transkripce má za následek neúspěšnou ligaci a amplifikaci a umožní tak odlišení nesprávné báze.

Ačkoliv LCR není kvantitativní metodou, její modifikace využívající pouze jedné dvojice sousedících oligonukleotidů, nazývaná též **ligázová detekční reakce (LDR)** nebo častěji **oligonukleotidové ligační stanovení (OLA)** s lineární kinetikou amplifikace, může být kvantitativní. Ve spojení s analýzou produktů PCR, kde se dá očekávat dostatečné množství templátu, je OLA používáno jako účinný detekční systém bodových mutací (PCR-OLA). Tento přístup nevyžaduje průkaz amplifikovaného produktu na elektroforéze, ale využívá 5'-koncového značení první oligonukleotidové sondy afinitní značkou – biotinem a opačného konce druhé sondy reportérskou značkou (např. fluorescenční látkou, digoxigeninem nebo alkalickou fosfatázou). Pouze po ligaci jsou obě značky nesený jednou molekulou. Po ligázové reakci jsou produkty zachyceny na afinitní matici se streptavidinem a neligované reportérské sondy jsou odmyty. Navázaný materiál je měřen na základě fluorescence, barevné reakce nebo enzymatické aktivity. Specifická detekce signálu může být založena i na principu přenosu energií mezi fluorofory nesenými oligonukleotidy (DOL). Pokud molekula vytvořená ligací získá příslušné fluorescenční značky na obou koncích, je detekován specifický signál na základě FRET. DOL se může stát v budoucnu rozšířenou automatizovanou metodou využívající DNA-čipy pro detekci nízkokopiových cílů a jednonukleotidových polymorfizmů.

TECHNOLOGIE CIRKULUJÍCÍ SONDY (CPT). CPT využívá hybridizaci cílové sekvence DNA (může být použit i amplifikovaný produkt PCR) s chimérickou na obou koncích fluorescenčně značenou DNA-RNA-DNA sondou, která po navázání na komplementární sekvenci poskytuje místo štěpitelné RNázou H. Reakce probíhá za specifické konstantní teploty, která umožňuje jak hybridizaci sondy, tak zachování templátové DNA v jednořetězcovém stavu. Vytvořený duplex chimérické sondy a cílové sekvence je rozpoznán RNázou H a RNA-sekvence sondy je degradována. Rozštěpené fragmenty sondy nemají v cílovém místě při reakční teplotě stabilní vazbu a disociují do prostředí. Uvolněná fluorescenčně značená část sondy emituje fluorescenci, jejíž intenzita je měřena. Cílové místo je potom volné, hybridizuje s další molekulou sondy a celý cyklus se opakuje (obr. 73).

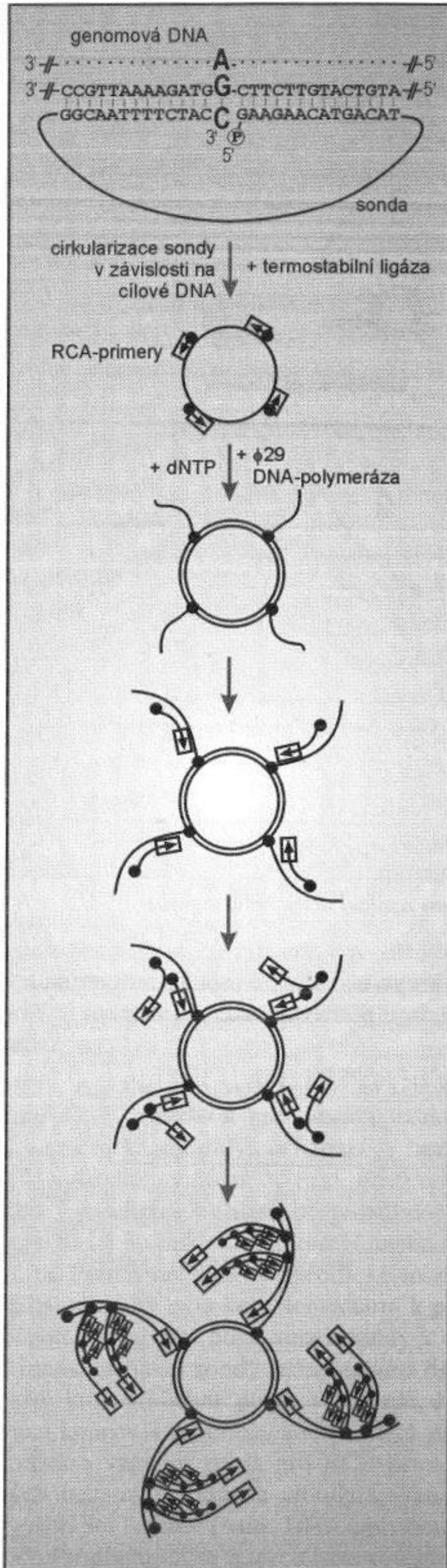
Fragmenty sondy se akumulují lineární kinetikou a slouží jako základ pro detekci a kvantifikaci cílové sekvence. CPT je jednoduchá izotermická metoda používající pouze jednu sondu a jeden enzym. Její výhodou ve srovnání s PCR je, že cílová sekvence sama o sobě není amplifikována a tím se minimalizuje riziko přenosu kontaminace. Současnou snahou je optimalizace reakce CPT tak, aby bylo možné detekovat jednonukleotidové polymorfizmy.

AMPLIFIKACE OTÁČIVOU KRUŽNICÍ (RCA). RCA je citlivá metoda amplifikace sondy navržená pro detekci jednonukleotidových polymorfizmů přímo v genomové DNA. Pro každý polymorfizmus je navržena alelově specifická sonda, kterou tvoří oligonukleotid dlouhý 80 až 90 bází. Fosforylovaný 5'-konec sondy nese přibližně 20 nukleotidů, které hybridizují k oblasti bezprostředně vedle 5' polymorfního místa. 3'-konec sondy obsahuje 10 až 20 nukleotidů, komplementárních k oblasti bezprostředně vedle 3'-polymorfního místa. Používané alelově-specifické sondy jsou identické s výjimkou báze na 3'-konci, která se liší tak, aby byla komplementární k polymorfnímu místu. První krok RCA zahrnuje společnou hybridizaci obou konců sondy k cílové sekvenci (vytvoření otevřené kružnice) a diskriminační ligaci sondy termostabilní ligázou, jejímž výsledkem je kružnicová ssDNA. Ligační krok proběhne pouze v případě, že se 3'-konec sondy páruje s polymorfním místem. Mezi koncovými rameny sondy, která jsou cílově specifická pro detekovanou sekvenci jsou umístěna vazebná místa pro RCA-primery. Po hybridizaci RCA-primerů, případně náhodných hexanukleotidů na cirkularizovanou sondu dochází v přítomnosti DNA-polymerázy vytěsňující řetězce (např. DNA-polymeráza fága 29) k izotermické replikaci otáčivou kružnicí. Prodlužující se řetězce jsou vytěsňovány a tvoří jednořetězcové konkatemery původní



Obr. 73 Technologie cirkulující sondy (CPT) používaná pro zesílení detekčního signálu

sondy, na které se mohou vázat další RCA-primery a vytvořit složité replikativní struktury (obr. 74). Proces amplifikace umožňuje automatizaci, a je používán také pro detekci jedno-nukleotidových polymorfizmů technologií DNA-čipů.



Obr. 74 Vznik replikačních struktur při izotermické replikaci otáčivou kružnicí (RCA)

VII. Transgenika

V předchozích kapitolách jsme popsali, jakým způsobem mohou být geny izolovány, cíleně modifikovány a amplifikovány. V této části se budeme věnovat popisu způsobů, kterými lze tyto geny přenést do eukaryotických buněk. Tyto metody je možno rozdělit do 3 skupin na metody biochemické, fyzikální a biologické. Výběr metody záleží na konkrétním cíli daného experimentu, na vlastnostech dané buněčné linie a na požadované účinnosti systému. Obvyklým cílem těchto postupů je studium funkce přenášených genů.

1. Transfekce přechodná a stabilní

Z hlediska stability přenášeného genu v transfekované buňce rozlišujeme transfekci přechodnou a stabilní. Při přechodné transfekci se cizorodý gen v hostitelské buňce udržuje jen dočasně, protože se nespojuje s chromozomem a v důsledku absence příslušných signálních sekvencí není jeho replikace sladěna s replikací genomu. Během několika dnů se cizorodý gen z množících se buněk „vyřadí“. Při přechodné transfekci je však možné krátkodobě dosáhnout vysoké exprese přenášeného genu, protože jedna buňka může být transfekována několika kopiemi téhož genu. Při stabilní transfekci se cizorodý gen rekombinací začleňuje do genomu hostitelské buňky, stává se jeho stálou součástí a spolu s ním se replikuje. Stabilní transfekce buněk nastává s velmi nízkou frekvencí. Udává se, že pouze 1 buňka z 10^5 – 10^6 buněk je schopna přijmout transfekční DNA a začlenit ji do chromozomu. Dosud není známo, co tyto kompetentní buňky odlišuje od buněk nekompetentních. Z nízké frekvence stabilní transfekce vyplývá, že po jejím provedení musí být vzácné transfekované buňky odlišeny od většiny buněk netransfekovaných. Tento problém se obvykle řeší selekcí transfektantů, která je zpravidla založená na použití selekčního činidla umožňujícího růst pouze buňkám transfekovaným a nikoliv buňkám, které cizorodou DNA nepřijaly. Gen zajišťující rezistenci k danému selekčnímu činidlu je buď nesen stejnou molekulou transfekční DNA, která kóduje testovaný gen nebo je nesen samostatnou molekulou DNA, která se přidává do transfekční směsi. Vzhledem k tomu, že kompetentní buňka může přijmout více než jeden fragment cizorodé DNA, nemusí být selekční marker přítomen ve stejné molekule DNA jako vlastní transgen. V další části této kapitoly stručně popíšeme jednotlivé transfekční a selekční metody.

BIOCHEMICKÉ TRANSFEKČNÍ POSTUPY. Tradičně se k přenosu DNA do různých adherujících i suspenzních buněk používá **transfekce zprostředkovaná fosforečnanem vápenatým**. Princip této metody spočívá v tvorbě jemné sraženiny fosforečnanu vápenatého a DNA, která se dotýká buněčného povrchu a je pohlcována endocytózou. Po vstupu do buněk, sraženina částečně uniká z endozomů nebo lysozomů a vstupuje do cytoplazmy, odkud postupuje do jádra. Podle typu použitého buněčného systému může až 50 % buněk přechodně exprimovat transfekované geny. Je popsána řada variant této metody, které se liší ve způsobu tvorby sraženiny před přidáním k buňkám, jejichž smyslem je zajištění správné „hrubosti“ sraženiny, aby její endocytóza byla co nejúčinnější při zachování dostatečné životaschopnosti buněčné populace. Dalšími faktory, které ovlivňují účinnost metody je velikost a koncentrace DNA (přítomnost vysokomolekulární DNA ve sraženině zvyšuje účinnost transfekce nízkomolekulárními, např. plazmidovými DNA). Důležitá je rovněž přesnost nastavení pH a koncentrace vápenatých a fosfátových iontů.

Pro některé typy živočišných buněk (např. buňky COS, CV-1, BSC-1) se doporučuje **transfekce zprostředkovaná dietylaminoetyl (DEAE) dextranem**. I když přesný mechanismus působení DEAE dextranu není známý, předpokládá se, že tento vysokomolekulární a kladně nabitý polymer slouží jako most mezi negativně nabitými molekulami DNA a negativně nabitým povrchem buňky. Jakmile se komplexy DEAE dextran/DNA přenesou do buněk endocytózou, DNA se v postupně se okyselujících endozomech uvolňuje z komplexu a dosud neznámým mechanismem přechází do jádra. Ve srovnání s transfekcí zprostředkovanou fosforečnanem vápenatým má technika založená na použití DEAE dextranu několik zvláštností: (1) doporučuje se pouze pro přechodnou a nikoliv stabilní transfekci, (2) funguje výborně jen u vybraných buněčných typů, ale u většiny ostatních je podstatně méně účinná, (3) využívá menších koncentrací transfekční DNA.

Pro transfekci adherentních buněk, primárních buněčných linií i kultur rostoucích v suspenzi se často používá **lipofekčních postupů** založených na přítomnosti lipidových činidel. Tato činidla jsou schopna vytvářet umělé membránové měchýřky (lipozomy), které transfekční DNA obklopí a buď následně fúzí s buněčnou membránou nebo jsou do buňky přeneseny nereceptorovou endocytózou. Avšak podobně jako u jiných transfekčních technik zůstává i po lipofekci většina transfekční DNA spojená s membránovými složkami buňky a jen malé procento lipozomů dopraví DNA až do jádra. Jsou popsány dvě skupiny lipozomálních transfekčních činidel, které se liší svým elektrickým nábojem. Transfekce prostřednictvím negativně nabitých lipozomů byla provedena již v 70. letech 20. století. V tomto případě musí být vytvořeny relativně velké lipozomy, které obsahují vodné prostředí vhodné pro přenašenou nukleovou kyselinu. Tato technika pro svou obtížnou reprodukovatelnost však nezískala velkou popularitu. V současné době jsou mnohem populárnější techniky, které využívají lipidů s kladným nábojem. Jejich výhodou je, že lipofekční činidla vytvářejí s molekulou DNA komplexy spontánně na základě iontových interakcí. Lipidová povaha přenašeče pak umožňuje fúzi s buněčnými membránami a tím přenos DNA do buněk.

K transfekci některých buněčných linií (např. buněk CHO nebo keratinocytů) nízkomolekulární (tj. plazmidovou) DNA lze použít **polykationty** jako polybren (1,5-dimethyl-1,8-diazaundekametylen polymetobromid) a poly-L-ornitin spolu s dimetylsulfoxidem (DMSO). DNA vytváří s polykationty komplexy, jejichž přenos do buněk je usnadněn permeabilizací buněčné membrány a osmotickým šokem, které zajišťuje DMSO.

FYZIKÁLNÍ TRANSFEKČNÍ POSTUPY. **Elektroporace** se používá pro přechodnou i stabilní transfekci rozmanitých bakteriálních, savčích i rostlinných buněk. Podstatou této metody je aplikace krátkého elektrického pulzu o vysokém napětí, který v plazmatické membráně buněk vyvolá tvorbu pórů, kterými do buněčné cytoplazmy přechází transfekční DNA. Účinnost metody významně ovlivňuje síla aplikovaného elektrického pole, délka elektrického pulzu, teplota, konformace a koncentrace DNA a iontové složení média. Přesto, že je popsána řada transfekčních technik, některé typy buněk, tkání nebo nitrobuněčných organel zůstávají odolné a cizorodou DNA nepřijímají žádné z nich. Tento problém, který je zvláště akutní u rostlinných buněk, byl do značné míry vyřešen vynálezem **genové pušky** („gene gun“). Toto zařízení umožňuje vytvořit v tlusté stěně rostlinných buněk otvory nastřelováním kovových částic pokrytých DNA. Přes počáteční skeptický postoj většiny vědců, tento přístup ukázal svou funkčnost a většina dnes používaných transgenních obilovin byla připravena touto technologií. Účinnost transfekce prostřednictvím genové pušky závisí na (1) buněčném typu (bakterie, rostliny i hepatocyty živých hlodavců byly úspěšně transfekovány mikroprojektily, ale experimentální podmínky byly vždy odlišné), (2) na buněčné hustotě a stupni proliferace (požadavky na tyto parametry jsou rovněž specifické pro různé buněčné typy), (3) na kultivačním médiu (účinnost metody se zvýší, pokud jsou cílové buňky kultivované v médiu s vyšším osmotickým tlakem), (4) na nastavení parametrů pušky

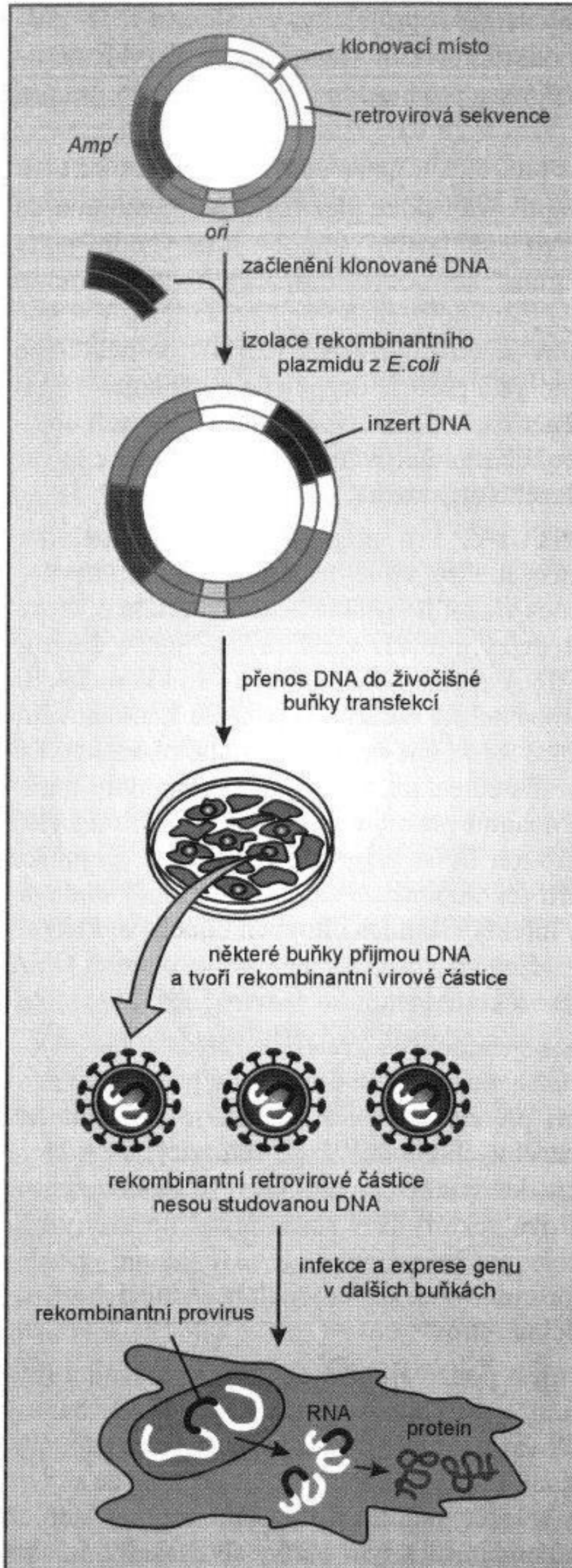
(stupeň vakua ve střelné komoře, míra tlaku hélia na mikroprojektily, vzdálenost mezi puškou a cílovými buňkami), (5) na typu a velikosti mikroprojektilů (používají se obvykle částice zlata nebo wolframu pokryté DNA o průměru 0,6 μm pro buněčné organely až 1,6 μm pro savčí buňky).

Mechanického způsobu přenosu DNA do buněčných jader využívá technika **mikroinjekce**. V tomto případě je roztok DNA přímo aplikován skrze plazmatickou membránu do cílové buňky tenkou jehlou mikromanipulátoru. Pro tento postup jsou obzvláště vhodná jádra oocytů a vajíček a často se využívá např. pro transfekci oocytů drápatky *Xenopus laevis*. Dalším důležitým cílem pro mikroinjekce DNA je jádro oplozeného myšního vajíčka. V tomto případě je cílem experimentu dosáhnout toho, aby se cizorodá DNA včlenila do některého z chromozomů a přenášela se do všech buněk embrya a posléze dospělého organismu. Organismy, které byly genovým inženýrstvím pozměněny tak, že ve svých chromozomech obsahují cizí geny, se označují jako transgenní a slouží k monitorování místní a časové exprese daného genu a jeho významu pro vývoj a život daného organismu.

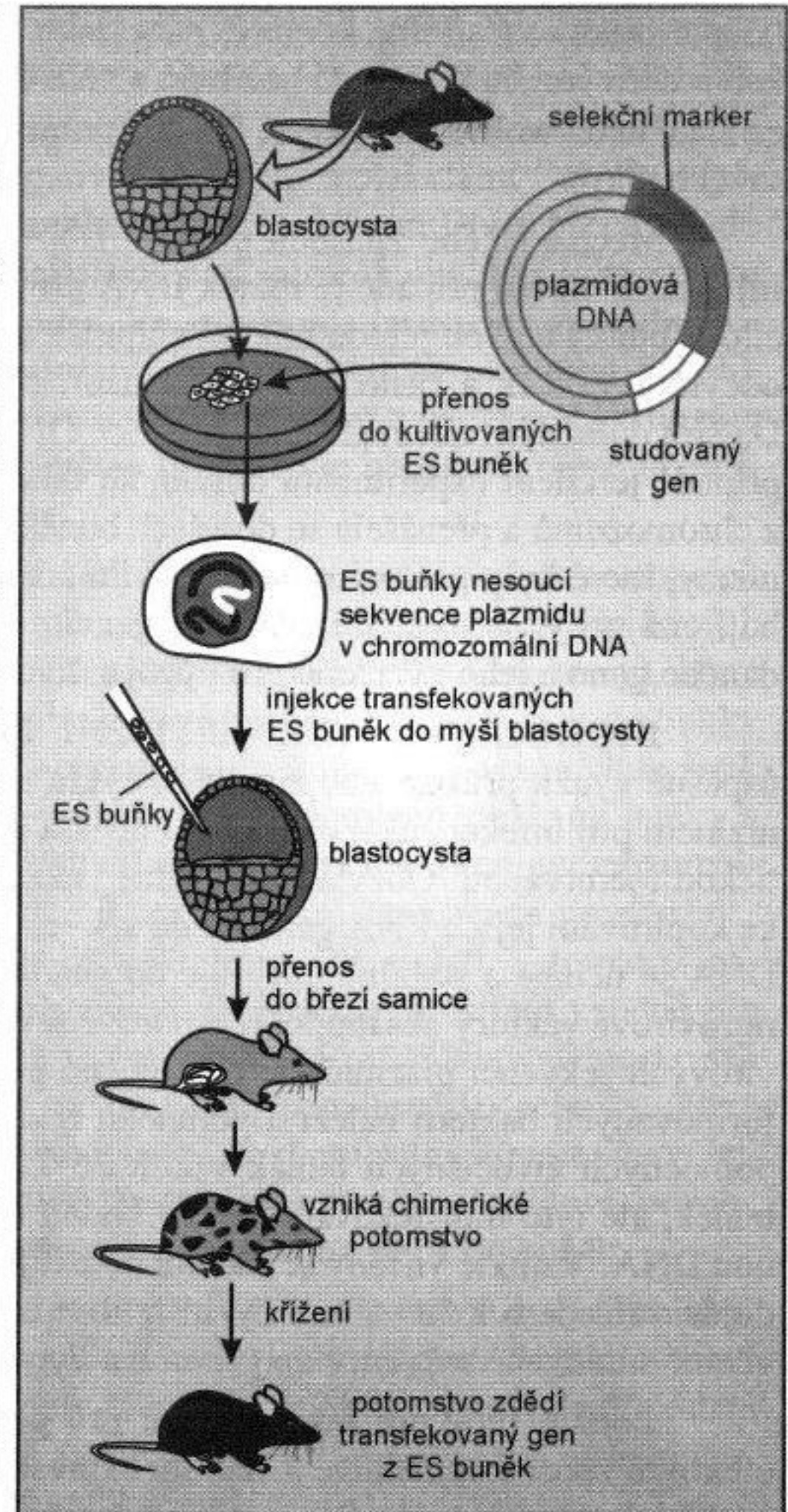
BIOLOGICKÉ TRANSFEKČNÍ POSTUPY. Pro přenos DNA do buněk lze úspěšně využít přirozeného životního cyklu některých virů, které disponují účinným mechanismem pro infekci eukaryotických buněk a přenos vlastního genetického materiálu plazmatickou membránou. Obzvláště výhodné jsou **retroviry**, protože v infikované buňce dochází ke kopírování jejich RNA genomu do sekvence DNA zpětnou transkripcí a vzniklá molekula DNA se účinně a stabilně integruje do genomu hostitelské buňky. Byly proto konstruovány retrovirové vektory obsahující retrovirové sekvence začleněné do bakteriálního plazmidu. Do virových sekvencí plazmidu je pak možno přenést studovanou DNA, prostřednictvím transformovaných bakterií nalézt a pomnožit rekombinantní plazmidy a použít je pro transfekci pomocných živočišných buněk v kultuře. Cizorodou DNA přijme jen malá část populace buněk, ale tyto transfekované buňky budou tvořit rekombinantní retroviry nesoucí studovanou DNA. Vzniklé viriony se mohou použít pro infekci vlastních cílových buněk, ve kterých dojde vzhledem k životnímu cyklu retroviru k začlenění virového genomu v podobě DNA včetně studované sekvence do genomu a vytvoření rekombinantního proviru (obr. 75).

Použití retrovirů jako vektorů pro přenos genetického materiálu představuje velmi efektivní způsob spolehlivé a stabilní exprese transgenu, který se udržuje i v potomstvu hostitelské buňky. Nevýhodou využití retrovirů při přenosu DNA do buněk je nedostatečná účinnost infekce nedělicích se buněk, tj. např. nervových buněk. Navíc retroviry, mezi které patří například HIV, zahrnují významné patogeny, které u živočichů i člověka mohou způsobovat některé typy rakoviny. Používané retrovirové vektory jsou samozřejmě upraveny tak, aby neměly tyto nežádoucí účinky, ale jejich široké použití pro účely genové terapie vyžaduje velmi podrobné analýzy a kontroly, aby byla eliminována rizika jejich nežádoucích modifikací např. po interakci s přirozeně se vyskytujícími retroviry.

Kromě retrovirů se pro přenos genů do myši používají také postupy využívající myších embryonálních kmenových („embryonal stem“ – ES) buněk. Tyto buňky jsou odvozeny z raných myších embryí (blastocyst), lze je udržovat v kultuře a opět přenést do raných myších embryí, kde se zapojí do normální tvorby tkání. Princip metody spočívá v tom, že se tyto buňky v kultuře podrobí transfekci, provede se selekce stabilních transfektantů, ve kterých došlo k začlenění cizorodé DNA do genomu rekombinací a tyto buňky se následně injekcí přenesou zpět do recipientní blastocysty, kde se po přenosu do březí samice zapojí do přirozených vývojových procesů (obr. 76). Část potomstva pak bude obsahovat buňky odvozené od pozměněných kmenových buněk a zároveň buňky pocházející z normálních buněk blastocysty. Tyto myši, které představují směs dvou různých buněčných typů, se označují jako



Obr. 75 Použití retrovirových vektorů pro přenos cizorodých genů do živočišných buněk



Obr. 76 Využití transfekovaných embryonálních kmenových (ES) buněk pro přenos cizorodého genu do myši. Pokud se transgen začlení do zárodečných buněk lze křížením chimerických myši získat myši transgenní.

myši chimérické. V některých z nich mohou být buňky pocházející z transfekovaných kmenových buněk začleněny do zárodečné linie. Křížením takovýchto myši vzniká potomstvo, které daný transgen stabilně udržuje ve svém genomu.

Mezi biologické transfekční postupy patří přenosy DNA do rostlinných buněk prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato bakterie vyvolává tvorbu nádorů na tělech rostlin. Patologické účinky *A. tumefaciens* souvisí s přítomností plazmidu označovaného jako Ti plazmid („tumor-inducing“), který je po svém přenosu z bakterie do rostlinných buněk schopen vyvolat tvorbu nádoru. Za tento účinek zodpovídá část plazmidu označovaná jako T-DNA, která se integruje do chromozomu rostlinné buňky. Pokud se do T-DNA začlení žádaná nukleotidová sekvence, dojde k jejímu přenosu do rostlinných buněk. Přirozeně se vyskytující Ti plazmidy jsou však příliš velké (více než 200 kb) a proto nejsou vhodné pro klonovací účely. Tento problém však lze vyřešit pomocí tzv. binárního vektorového systému, který využívá dvou plazmidů. Prvním je malý pomocný plazmid *E. coli*, který nese část T-DNA Ti plazmidu. Do sekvence T-DNA tohoto plazmidu se klonuje žádaný gen a rekombinantní plazmid se po pomnožení v buňkách *E. coli* přenesou konjugací do buněk *A. tumefaciens*, v nichž je přítomen druhý plazmid. Tento plazmid je derivátem Ti-plazmidu s odstraněnou T-DNA, ale schopný navodit přenos T-DNA (včetně klonovaného genu) z prvního plazmidu do rostlinné buňky.

SELEKČNÍ SYSTÉMY ŽIVOČIŠNÝCH BUNĚK. Pro analýzu funkce a exprese transfekovaných genů je obvykle nezbytné dosáhnout stabilní integrace transfekční DNA do genomu hostitelské buňky. Po vstupu do buňky je transfekční DNA částečně přenesena z cytoplazmy do jádra. Podle typu buňky může až 80 % buněk v populaci přechodně exprimovat transfekovaný gen. Během prvních několika hodin po transfekci prochází cizorodé molekuly DNA procesy nehomologní intermolekulární rekombinace a ligace, které vedou k tvorbě konkatemerů a k případné integraci do chromozomu buňky. Protože pravděpodobnost příjmu DNA buňkou, její integrace do chromozomu a exprese je velmi nízká, je získání stabilních transfektantů obvykle podmíněno selekcí buněk, které získaly nový fenotyp. Pro zajištění možnosti selekce transfektantů se transfekční směs obohacuje o DNA, která hostitelské buňce zajišťuje rezistenci na určité antibiotikum. Buňky transfekované touto pomocnou DNA exprimující příslušný selekční marker obvykle exprimují i testovaný gen přítomný v transfekční směsi a to i přesto, že obě kódující sekvence mohou být nesené dvěma samostatnými molekulami DNA.

Původní selekční systémy vyvinuté v 70. letech 20. století byly založeny na principu obnovení porušených metabolických drah v buňce. Prvním genem, který se používal pro zajištění selekce transfekovaných savčích buněk byl gen kódující **tymidinkinázu** (TK) viru herpes simplex. Mutantní buňky s inaktivní tymidinkinázou byly transfekovány genem HSV-TK a získaly tak schopnost růstu na selekčním médiu obsahujícím aminopterin. TK katalyzuje jednu z reakcí alternativní dráhy syntézy dTTP z tymidinu. Za normálních podmínek tento enzym není pro růst buněk nezbytný, protože buňky obvykle syntetizují dTTP z dCDP. Avšak buňky rostoucí za přítomnosti aminopterinu nemohou tuto obvyklou dráhu syntézy dTTP používat a jsou tak závislé na přítomnosti funkční tymidinkinázy. Buňky TK⁻ mohou v médiu obsahujícím aminopterin růst pouze tehdy, jestliže došlo k úspěšné stabilní transfekci a expresi cizorodého genu kódujícího TK, který byl přítomen v transfekční směsi. Slabinou tohoto přístupu však byla nutnost přípravy TK⁻ variant každé buněčné linie určené k transfekci. V dalších letech se proto výzkum zaměřil na zavedení nových selekčních systémů a vedl k objevům dominantních selekčních markerů, které transfekovaným buňkám umožňovaly růst za přítomnosti antibiotik. Mezi tyto novější selekční markery patří např. aminoglykosid fosfotranferáza (poskytující rezistenci na G418 nebo neomycin), hygromycin-B fosfotranferáza (poskytující rezistenci na hygromycin B), xantin-guanin fosforibozyl-

transferáza (poskytující rezistenci na kyselinu mykofenolovou a aminopterin) a puromycin-*N*-acetyl transferáza (poskytující rezistenci na puromycin).

Nejčastěji používaným selekčním činidlem při stabilních transfekcích je aminoglykosidové antibiotikum **G418**, které je svou strukturou příbuzné neomycinu, gentamycinu a kanamycinu. G418 na buňky působí tak, že narušuje funkci ribozomů a tak blokuje proteosyntézu. Bakteriální enzym aminoglykosid fosfotransferáza, pozměňuje G418 do netoxické formy.

Hygromycin B je antibiotikum, které syntetizují bakterie *Streptomyces hygroscopicus*. Jeho mechanismus účinku spočívá rovněž v inhibici proteosyntézy jak prokaryotických, tak eukaryotických buněk, kterou vyvolává zablokováním translukace. Inaktivaci hygromycinu B zajišťuje enzym hygromycin B fosfotransferáza, který je rovněž bakteriálního původu.

Metotrexát je analogem dihydrofolátu, který účinně inhibuje jeden z enzymů nutných pro biosyntézu purinů – dihydrofolát reduktázu (DHFR). Zvyšující se hladina metotrexátu může vést k amplifikaci genu kódujícího DHFR s adekvátním zvýšením jeho exprese. Tento systém je proto velmi účinným prostředkem pro zvýšení počtu kopií současně transfekovaných genů.

Kyselina mykofenolová specificky inhibuje inosinát dehydrogenázu, tj. enzym, který katalyzuje přeměnu inosinmonofosfátu na xantinmonofosfát (XMP), což je jeden z kroků biosyntézy guanosinmonofosfátu. Tento blok lze uvolnit za předpokladu, že buňky mají k dispozici xantin a funkční produkt genu *gpt* *E. coli* kódující enzym xantin-guanin fosforibozyltransferázu, který konvertuje xantin na XMP. Gen *gpt* lze proto použít za přítomnosti kyseliny mykofenolové jako dominantní selekční marker transfekovaných savčích buněk. Účinnost selekce lze ještě zvýšit přidáním **aminopterinu**, který blokuje endogenní dráhu biosyntézy purinů.

Puromycin, jako analog aminoacyl RNA, způsobuje předčasné ukončení syntézy aminokyselinových řetězců a působí tedy jako inhibitor proteosyntézy. Inhibice puromycinu lze dosáhnout jeho acetylací, kterou zajišťuje puromycin-*N*-acetyl transferáza.

2. Cílené zásahy do genové exprese

Expresi genů lze ovlivnit mnoha různými způsoby, které lze rozdělit na přístupy genetické a epigenetické podle toho, zda jsou, nebo nejsou založeny na zásahu do primární struktury DNA. Genetickými přístupy lze posílit a nebo naopak oslabit, případně úplně eliminovat expresi určitého genu např. tím, že se přenosem cizorodého genu (tzv. transgenu) s vlastním promotorem stabilně obohatí genetická výbava dané buňky či organismu nebo se gen změnou struktury kódující nebo regulační sekvence částečně nebo úplně vyřadí z funkce. Epigenetickými přístupy lze rovněž dosáhnout změny genové exprese, a to buď ovlivněním struktury chromatinu, změnou úrovně metylace DNA nebo zásahy do procesu genové exprese regulací stability transkriptu, na úrovni translace nebo na úrovni regulace funkce proteinového produktu. V předchozí části této kapitoly jsme se věnovali metodickým přístupům pro přenos cizorodé DNA do buněk, které představují genetické zásahy do genové exprese. V následující části se zaměříme na přístupy epigenetické.

METYLACE DNA. Jako metylace DNA se označuje DNA metyltransferázami katalyzované připojení metylové skupiny na C5 uhlík cytozinu, které vede k vzniku 5-metylcytozinu v dinukleotidech CpG. Donorem metylové skupiny je S-adenosyl-L-methionin. Metylací je v genomu obratlovců modifikováno 60–90 % všech CpG. Nemetylované

sekvence CpG jsou zastoupeny v tzv. CpG ostrovech, které se nacházejí v oblastech promotorů. Hypermethylace těchto sekvencí způsobuje zastavení přepisu příslušných genů např. tím, že znemožní navázání transkripčních faktorů na cílová místa v DNA. Reaktivace exprese genů umlčených metylací lze dosáhnout působením inhibitorů metylace DNA. Mezi známá demetylační činidla patří např. 5-azacytidin, jeho analog 5-aza-2'-deoxycytidin nebo nově objevený zebularin. Tyto nukleosidové analogy inhibují metylaci DNA tím, že tvoří kovalentní vazbu s DNA metyltransferázou a tak omezují její aktivitu. Demetylační činidla se používají při reaktivaci genové exprese při léčbě některých nádorových onemocnění.

ACETYLACE HISTONŮ. Jako acetylace histonů se označuje přenesení acetylové skupiny z acetylkoenzymu A na lyzin, který je součástí N-koncové části histonů. Acetylace histonů je katalyzována histonovými acetyltransferázami (HAT), deacetylaci histonů katalyzují histonové deacetylázy (HDAC). Aktuální úroveň acetylace histonů je výsledkem okamžitého vychýlení rovnováhy mezi těmito opačně působícími enzymovými aktivitami. Úroveň acetylace histonů ovlivňuje strukturu chromatinu. Odstraněním acetylové skupiny získá lyzin pozitivní náboj, kterým zvýší afinitu k polyaniontu DNA a vzniká kompaktní chromatin, který není přístupný transkripci. Acetylované histony jsou proto spjaty s transkripčně aktivním chromatinem, zatímco deacetylované histony se nacházejí v inaktivním chromatinu a podílejí se na potlačení transkripce. Zásahy do úrovně acetylace histonů se proto mohou projevit změnou úrovně genové exprese. V terapii nádorových onemocnění nacházejí uplatnění inhibitory HDAC, protože v těchto buňkách bývá rovnováha mezi aktivitami HAT a HDAC často narušena ve prospěch HDAC, což se projevuje např. umlčením exprese důležitých nádorových supresorových genů. Inhibitory HDAC se podle chemické struktury dělí na deriváty kyseliny hydroxamové (trichostatin A, pyroxamid, oxamftalin, scriptaid), mastné kyseliny (butyrát sodný, fenylbutyrát), cyklické peptidy (depsipeptid, apicidin) nebo benzamidy (MS-275). Některé inhibitory HDAC brání deacetylaci histonů přímou vazbou na HDAC (např. trichostatin A), u jiných není mechanismus inhibice dosud popsán.

PROTISMYSLNÉ NUKLEOVÉ KYSELINY. Do epigenetických přístupů regulace genové exprese patří také využití protismyslných nukleových kyselin, které jsou založeny na sekvencně specifické hybridizaci nukleových kyselin pro eliminaci specifických transkriptů a dosažení cíleného potlačení jejich translace. Tohoto cíle může být dosaženo např. protismyslnými oligonukleotidy, protismyslnou RNA, ribozymy, DNázymy, návnadovými oligonukleotidy nebo RNA interferencí.

Protismyslné oligonukleotidy jsou sekvence DNA nebo peptidové nukleové kyseliny (PNA) dlouhé 6–30 nukleotidů, jejichž inhibiční účinek na genovou expresi vyplývá z vazby na komplementární sekvenci mRNA. Jsou popsány dva mechanismy, kterými protismyslné oligonukleotidy inhibují genovou expresi: buď spouští degradaci příslušné mRNA buněčnou RNázou H nebo brání její translaci. Protismyslné oligonukleotidy snadno podléhají degradaci nukleázami, a proto byly vytvořeny jejich různě modifikované varianty s cílem dosáhnout zvýšení stability. Nejpoužívanějšími variantami oligonukleotidů jsou fosforothiоátů, které jsou odolnější k exonukleázám i endonukleázám. Dalšími analogy jsou metylfosfonáty, fosfoamidové analogy a PNA. PNA je syntetický analog DNA, u kterého je cukr-fosfátová kostra nahrazena pseudopeptidovou kóstrou složenou z monomerů N-(2-aminoethyl) glycinu, ke kterým jsou připojeny dusíkaté báze. PNA jsou odolné k nukleázám a proteázám a ve srovnání s jinými oligonukleotidy vykazují vyšší specifitu a vysokou afinitu k RNA. PNA nemají elektrický náboj a na komplementární nukleové kyseliny se vážou Watson-Crickovým párováním bází pevněji než DNA nebo RNA. PNA, stejně jako některé další modifikované oligonukleotidy typu metylsulfonátů, neaktivují RNázu H a potlačují genovou expresi pouze tím, že blokují translaci daného transkriptu.

Protismyslné RNA jsou přepisy tzv. protismyslných genů, které jsou do buněk přeneseny expresními vektory. Na rozdíl od protismyslných oligonukleotidů, které buňky nejčastěji pohlcují endocytózou, vznikají protismyslné RNA až v cílových buňkách transfekovaných expresním vektorem obsahujícím pod kontrolou promotoru obráceně orientovanou cDNA. Protismyslná RNA je tedy komplementární k mRNA, která vznikla přepisem cílového endogenu. Vzniklý duplex RNA nemůže být podroben translaci.

Mezi **katalytické nukleové kyseliny** patří ribozymy a DNAzomy. **Ribozymy** jsou malé molekuly RNA, které katalyzují reakce ovlivňující cukr-fosfátovou kostru nukleové kyseliny. Pro zásahy do genové exprese jsou nejdůležitější ty katalytické nukleové kyseliny, které katalyzují štěpení mRNA. Specifické rozeznání substrátu zajišťuje párování bází mezi sekvencemi ohraničujícími cílovou fosfodiesterovou vazbu mRNA a sekvencemi ribozymu, které sousedí s jeho katalytickým jádrem. Po vazbě na cílovou sekvenci, jejím rozštěpení a degradaci dojde k uvolnění enzymu, který může hybridizovat s další molekulou mRNA obsahující stejnou cílovou sekvenci. Tento cyklus vazby a štěpení se opakuje mnohokrát, dokud enzym není sám degradován. Vzhledem k tomu postačuje pro degradaci dané mRNA v buňce relativně nízká koncentrace enzymu. **DNAzomy** jsou jednořetězcové molekuly DNA, které se skládají z vazebných ramen dlouhých 7–8 nukleotidů a katalytické domény složené z 15 nukleotidů. DNAzomy mohou štěpit jakoukoliv mRNA mezi purinovou a pyrimidinovou bází, jsou odolnější k nukleázám než ribozymy, ale jsou poněkud méně aktivní.

Návnadové („decoy“) oligonukleotidy jsou krátké sekvence DNA nebo PNA, které odpovídají určitému endogennímu *cis*-elementu přítomnému v regulační oblasti genu, jehož expresi chceme ovlivnit. Tím, že tyto sekvence napodobují vazebné místo na DNA pro daný transkripční faktor, vyvolávají kompetici mezi endogenním *cis*-elementem a návnadovým oligonukleotidem. Návnadové oligonukleotidy proto blokují vazbu transkripčního faktoru na promotory cílových genů, což se projeví inhibicí jejich aktivity. Terapeutické využití těchto oligonukleotidů však komplikují nežádoucí vedlejší účinky, které vyplývají z potlačení funkce transkripčních faktorů nutných pro normální fyziologické procesy a z interference s jinými proteiny. Další problém představuje toxicita a imunogenita některých modifikovaných oligonukleotidů.

RNA interference představuje další mechanismus, kterým lze dosáhnout posttranskripčního oslabení genové exprese. Podobně jako v předchozích případech využívá se i při RNA interferenci dvouřetězcové RNA, jejíž sekvence odpovídá struktuře cíleného transkriptu. Přítomnost této dvouřetězcové RNA v buňkách je obvykle důsledkem transkripce příslušné DNA, která se připraví manipulací *in vitro*, ligací se spojí s expresním plazmidovým vektorem a do buněk se přenesou transfekcí. Transkripcí vzniká jednořetězcová molekula RNA, která se však vzhledem k přítomnosti autokomplementárních sekvencí skládá do podoby dvouřetězcové vlásenky. Tuto strukturu rozeznává nukleáza rodiny RNáz III zvaná „Dicer“ a štěpí ji na krátké fragmenty o velikosti 21–23 nukleotidů, které se označují jako siRNA („small interfering RNA“). V dalším kroku se pak siRNA vážou na nukleázový komplex označovaný jako RISC („RNA-induced silencing complex“). Jeho součástí je helikáza, která pravděpodobně oba řetězce duplexu siRNA odvíjí a jeden z nich – protismyslný řetězec siRNA navádí aktivovaný komplex RISC ke komplementární cílové mRNA, která je následně rozštěpena. Nevýhodou RNA interference je, že není zcela specifická pro určitý gen, ale může ovlivnit i expresi genů příbuzných. Cílené zásahy do genové exprese mechanismem RNA interference jsou v současné době velmi populární.

Další přístupy zaměřené na ovlivnění genové exprese *in vivo* se zaměřují na její poslední stádium, tj. ovlivnění aktivity již syntetizovaných proteinů. Specifické zablokování funkce určitého buněčného proteinu lze dosáhnout např. **přenosem příslušné protilátky** do

buňky elektroporací. Jiného mechanismu využívají metody založené **na principu dominantní negativity**. Inhibice aktivity normálního funkčního proteinu lze dosáhnout tehdy, pokud se jeho podjednotky smísí s mutantními polypeptidovými podjednotkami, které změní jeho konformaci do neaktivní podoby. Postupuje se např. tak, že se do buněk transfekcí přenese zkrácená varianta genu, jehož funkci chceme eliminovat. Nadbytek mutantního proteinu způsobí inhibici jeho endogenní funkční formy, i za její současné přítomnosti v buňkách, a proto se tento mechanismus označuje jako dominantně-negativní. Příkladem použití dominantně negativního přístupu je inhibice transkripčních faktorů kontrolovaných hormonem, jejichž funkce je závislá na tvorbě dimerů. Za přítomnosti nadbytku zkrácených variant tohoto proteinu lze dosáhnout účinné inhibice tvorby funkčních dimerů a tak cíleně eliminovat funkci zvoleného proteinu.

VIII. Analýza genové exprese

Proces exprese genů lze rozdělit do dvou hlavních fází: transkripce (tj. přepisu DNA do RNA) a translace (tj. tvorby proteinu nebo polypeptidu podle templátu mRNA). Pro účely této kapitoly budeme předpokládat, že vznik polypeptidového řetězce je finálním produktem genové exprese. Záměrně zanedbáme posttranslační modifikace, jako skládání polypeptidů do správné konformace, navázání specifických skupin, apod., jejichž analýza vyžaduje speciální testy aktivity proteinu.

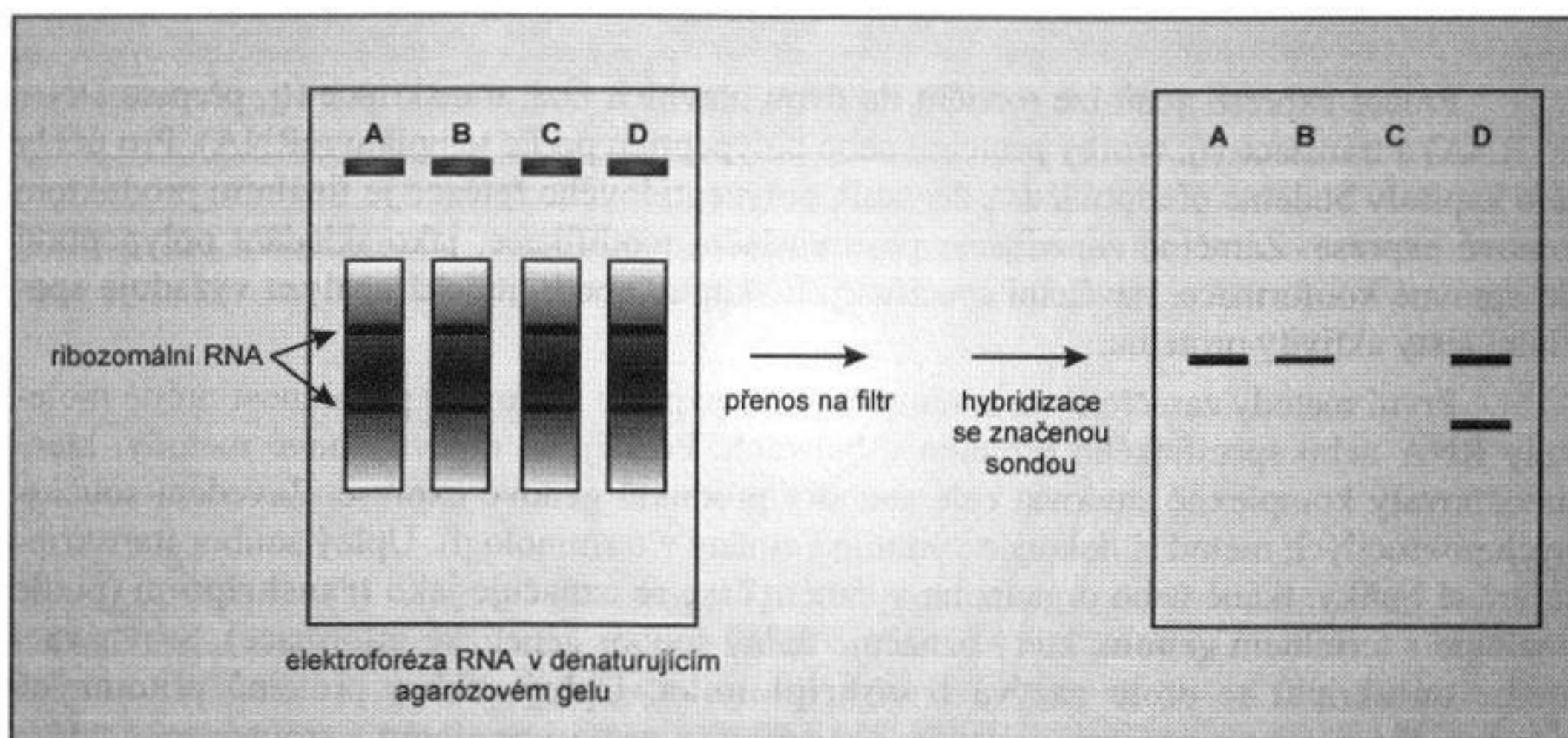
První metody zaměřené na studium genové exprese sledovaly přítomnost určité molekuly RNA nebo specifického proteinu v buňkách. Později se objevily nové metody, které umožňovaly komplexně studovat celé soubory produktů genové exprese. Zavedení současných pokročilých metod si dokonce vynutilo i změny v terminologii. Úplný soubor transkriptů určité buňky, tkáně nebo organismu v daném čase se označuje jako **transkriptom** (podle analogie s termínem **genom**, který označuje úplný soubor genetické informace). Srovnávací studie transkriptů se proto nazývá **transkriptomika**. Úplný soubor proteinů přítomných v buňce, tkáni nebo organismu v daném okamžiku se nazývá **proteom** a srovnávací analýza kompletní sady proteinů buňky se nazývá **proteomika**. V následující části budou popsány metody studia mRNA a proteinů. Nejprve se zaměříme na metody analýzy produktů jednotlivých genů a v další části na složitější přístupy.

1. Studium transkripce

Metody zaměřené na studium transkripce můžeme rozdělit na metody analyzující množství určitého transkriptu přítomného ve studovaném vzorku v daném čase a na metody, kterými se stanovuje transkripční aktivita spojená s daným genem. Při jakémkoli měření hladiny mRNA v buňce je třeba mít v patrnosti dvě omezení: (1) množství určité molekuly mRNA v buňce je v daném okamžiku nejen důsledkem transkripční aktivity příslušného genu, ale také míry stability transkriptu. Gen, který je transkribován relativně slabě, ale jeho transkript je stabilní, může poskytnout v daném okamžiku větší množství mRNA než gen, který je transkribován aktivněji, ale poskytuje nestabilní transkript; (2) množství mRNA nemusí nutně korelovat s množstvím jejího proteinového produktu, protože účinnost translace může významně kolísat.

NORTHERNOVÝ PŘENOS. Nejstarší metody detekce specifické mRNA jsou založeny na její hybridizaci se specifickými značenými sondami. Nejběžnější z nich se označuje jako northernový přenos. Northernový přenos zahrnuje elektroforetickou separaci molekul RNA purifikovaných z buněk, jejich následnou imobilizaci na membráně a hybridizaci se specifickou sondou (obr. 77). Tento postup umožňuje detekovat přítomnost specifické mRNA a odhadnout její velikost za předpokladu, že sonda je dostatečně specifická. Jestliže provedeme pečlivou kalibraci, např. na základě srovnání se silou hybridizačního signálu pomocného genu o známé úrovni exprese, můžeme northernovým přenosem získat informaci o relativní úrovni exprese daného genu (přesněji o relativním množství daného transkriptu) v buňce. Např. z obr. 77 je zřejmé, že vzorek B poskytl slabší signál než vzorek A, protože ve vzorku B je přítomno mnohem méně specifické mRNA než ve vzorku A. Tento závěr však můžeme učinit pouze za předpokladu, že nižší úroveň signálu není důsledkem zvýšené

degradace mRNA ve vzorku B. Ve vzorku C nebyla exprese daného genu zaznamenána vůbec, vzorek D obsahuje hledané sekvence na dvou různých molekulách mRNA.



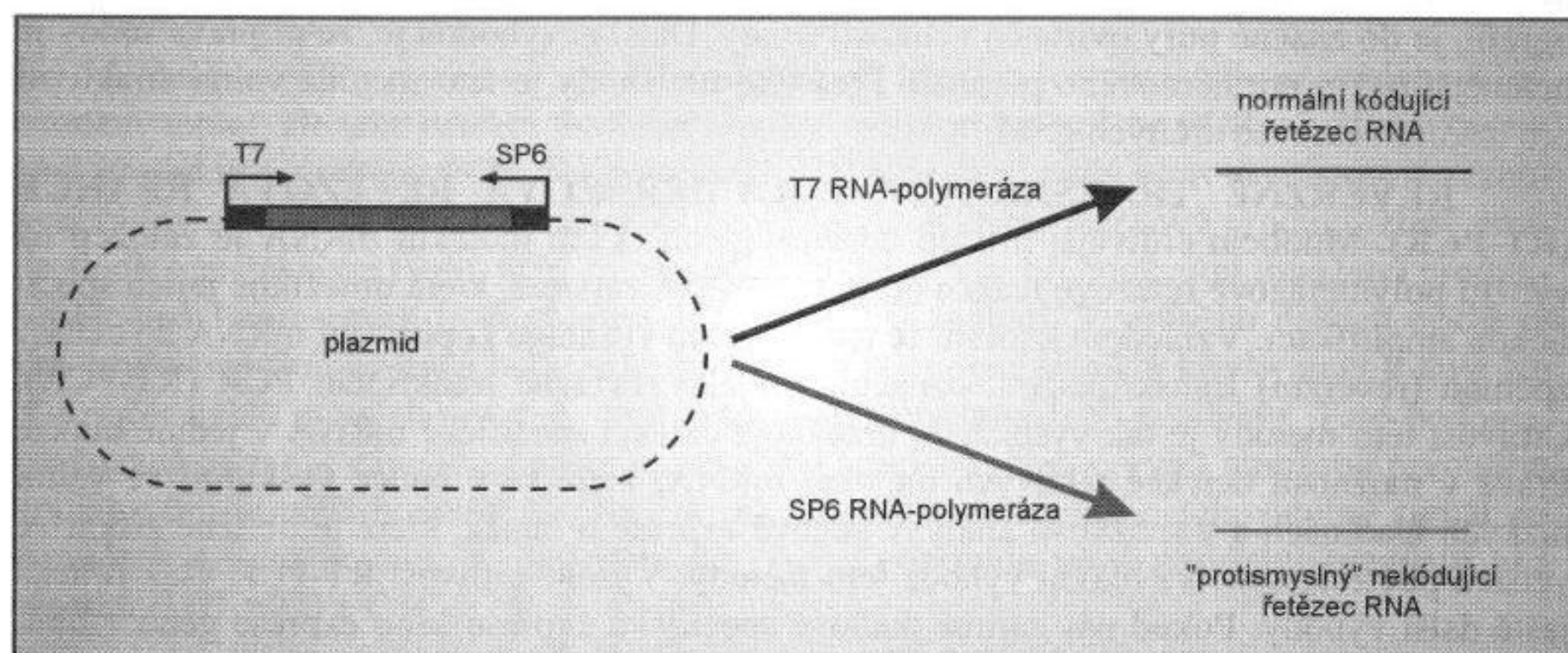
Obr. 77 Northernový přenos

Technika northernového přenosu má dvě hlavní slabiny, které omezují jeho použití: (1) poskytuje možnost posoudit pouze relativní intenzitu signálu, ale nemůže poskytnout údaje o absolutním množství dané mRNA; (2) citlivost metody není vysoká a vyžaduje použití poměrně vysokých množství RNA (obvykle alespoň 1 mikrogram mRNA nebo 10 mikrogramů celkové RNA). Získání takových množství výchozího materiálu nemusí být vždy snadné. Např. pokud studujeme expresi specifických genů v patogenní bakterii, která roste v infikovaném organismu nebo chceme studovat mRNA izolovanou z materiálu získaného biopsií, může být velmi obtížné získat dostatečné množství mRNA pro provedení northernového přenosu.

Výhodou northernového přenosu je (1) nižší riziko vzniku falešných artefaktů než u metod založených na PCR; (2) možnost určení velikosti specifického transkriptu a určení přítomnosti různých transkriptů daného genu. Např. na obr. 77 vidíme u vzorku D přítomnost transkriptu o nižší molekulové hmotnosti než u vzorků A a B. Právě tento fakt je velmi důležitý, vezmeme-li v úvahu, že z výsledků analýzy lidského genomu vyplývá, že počet genů je podstatně nižší než počet genových produktů. Toto pozorování lze vysvětlit existencí alternativního sestřihu, který se uplatňuje při zpracování transkriptů mnohých genů. Mezi důležité techniky, které analýzu alternativního sestřihu umožňují, patří právě northernový přenos.

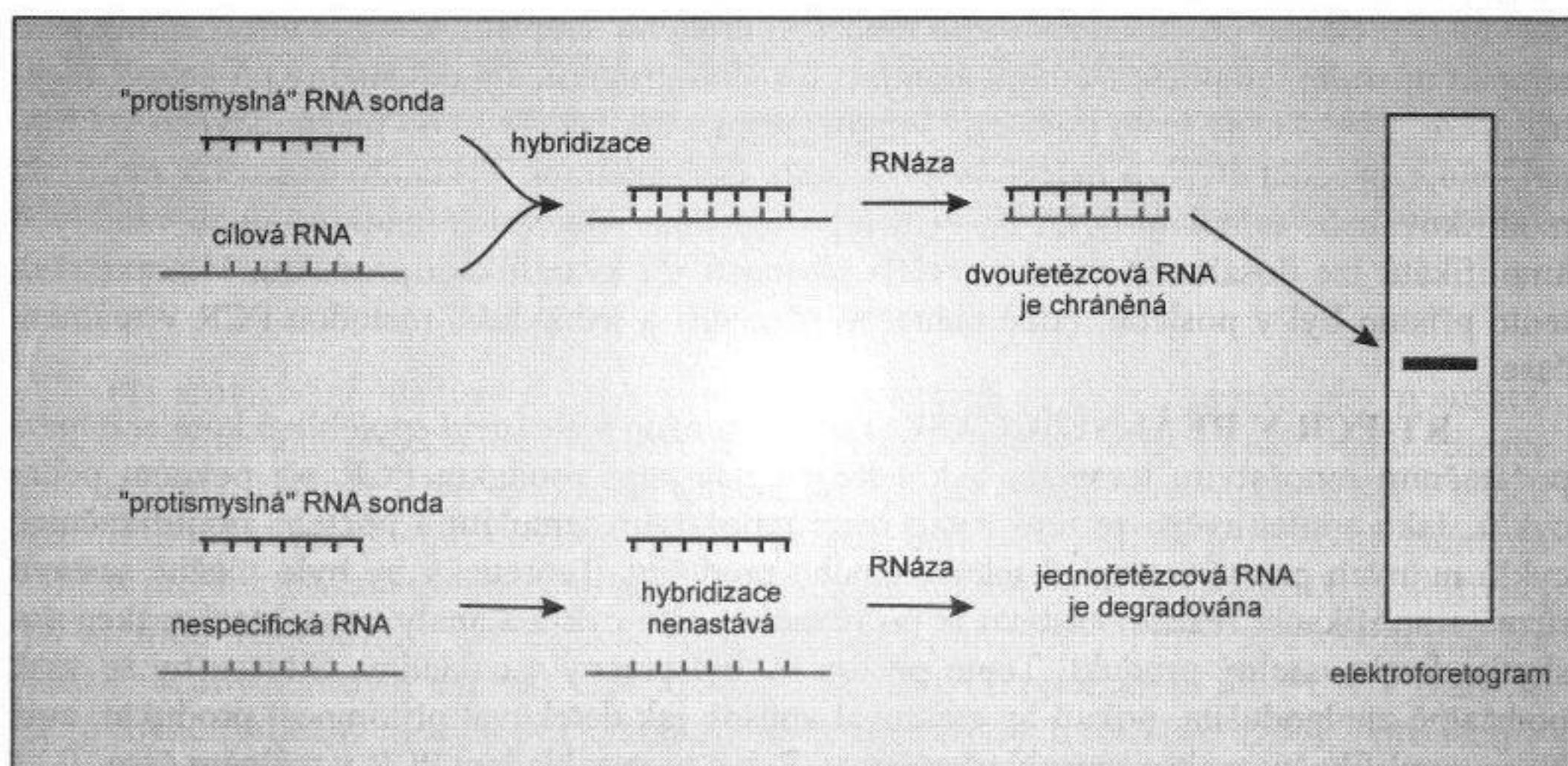
TEST OCHRANY PŘED ÚČINKEM RNÁZY („RNASE PROTECTION ASSAY“, RPA). Zatímco hybridizace se u northernového přenosu provádí na filtru (membráně), test ochrany před RNázami je založen na hybridizaci v roztoku. Jeho smyslem je identifikace určité molekuly RNA ve směsi různých molekul RNA izolovaných z daného biologického vzorku. Jako sonda se používá značená RNA v protismyslné orientaci. Tento typ sondy může být jednoduše připraven prostřednictvím plazmidových klonovacích vektorů, např. typu pGEM, které obsahují vazebná místa pro RNA-polymerázy (T3, T7 a/nebo SP6). V příkladě znázorněném na obr. 78 byl gen (případně jen jeho část) začleněn do vektoru mezi dva opačně orientované promotory. Po přidání RNA-polymerázy T7 a substrátů (NTP) bude vznikat normální kódující transkript daného genu. Protože tento gen je zároveň

v obrácené orientaci vzhledem k promotoru SP6, bude jej RNA-polymeráza SP6 přepisovat v opačném směru, tj. bude kopírovat druhý řetězec DNA za vzniku protismyslného („anti-sense“) transkriptu, který nebude mít kódující funkci. Produkty transkripce téhož genu RNA-polymerázou T7 a RNA-polymerázou SP6 budou komplementární a schopné vzájemné hybridizace.



Obr. 78 Tvorba normální a „protismyslné“ RNA obousměrnou transkripcí sekvence DNA

Po přidání značené sondy RNA, do vzorku všech molekul mRNA izolovaných z buněk, dojde k hybridizaci a tvorbě dvouřetězcové RNA pouze mezi sondou a komplementární hledanou sekvencí. Nespecifické molekuly mRNA zůstanou v jednořetězcové podobě. Následně lze všechny jednořetězcové mRNA rozložit RNázou, zatímco dvouřetězcové hybridní molekuly RNA budou před účinkem RNázy chráněny (obr. 79). Po dokončení štěpení RNázou se hybridizační směs nanese na polyakrylamidový gel, který se po elektroforéze vysuší a přiloží k citlivé vrstvě filmu, kde se přítomnost značené sondy navázané na cílovou sekvenci zviditelní.



Obr. 79 Test ochrany před účinkem RNázy

Popsaná metoda má některé výhody ve srovnání s northernovým přenosem. Je citlivější a umožňuje získat alespoň přibližnou představu o relativním zastoupení dané molekuly ve vzorku. Navíc toleruje částečnou degradaci vzorků RNA, protože pro úspěšnou hybridizaci postačuje, aby jen část molekul RNA bylo intaktních. Z jiného hlediska je tato výhoda zároveň nevýhodou, protože na rozdíl od northernového přenosu tento test neumožňuje určení velikosti transkriptu. Pohyblivost proužku, který po elektroforéze identifikujeme autoradiografií, je do značné míry ovlivněn velikostí sondy. Další nevýhodou je, že příprava sondy je pracnější než u northernového přenosu. Přes tyto nevýhody je tato metoda velmi atraktivní pro studium exprese určitých genů.

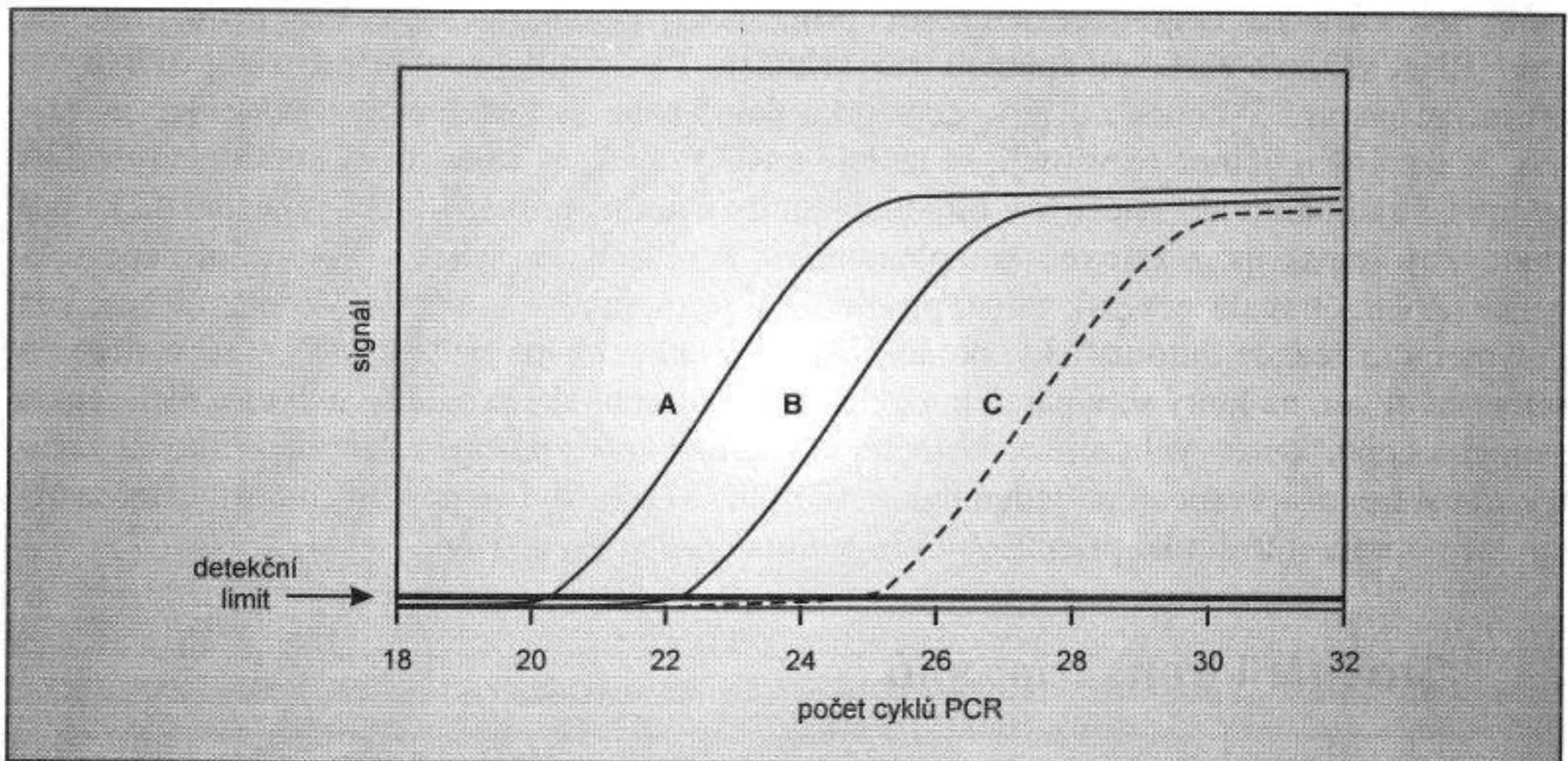
REVERZNĚ TRANSKRIPČNÍ POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (RT-PCR). Mnohem citlivější přístup detekce specifických molekul mRNA je založen na využití polymerázové řetězové reakce (kapitola VI) ve variantě, která umožňuje jejich specifickou amplifikaci. Vzhledem k tomu, že tento přístup vyžaduje kopírování mRNA do cDNA zpětnou (reverzní) transkriptázou, označuje se jako reverzně transkripční PCR (RT-PCR). Citlivost této metody je tak vysoká, že umožňuje detekci specifické mRNA v jediné buňce. Právě v možnosti detekce takových molekul mRNA, které se v buňce vyskytují ve velmi nízkých hladinách a v možnosti analýzy genové exprese u buněk, které je obtížné získat ve větších počtech, spočívá hlavní výhoda této metody. Vysoká citlivost RT-PCR však přináší ještě další výhody. Pokud nás zajímá tkáňově specifická exprese nebo exprese genů v buňkách za různých fyziologických podmínek, je potřeba zajistit, aby všechny buňky, ze kterých extrahujeme mRNA, exprimovaly stejný soubor genů. V případě northernového přenosu musíme pracovat s relativně velkým množstvím mRNA extrahovaným z velkého počtu buněk a tato buněčná populace může být heterogenní. RT-PCR vyžaduje mnohem méně mRNA a tím také nižší počet buněk. Je proto pravděpodobnější, že všechny buňky jsou v obdobném fyziologickém stavu a získané profily genové transkripce budou více odpovídat realitě.

Konvenční RT-PCR má svá omezení. Patří mezi ně obtížnost získání kvantitativních údajů o účinnosti transkripce. Nelze získat spolehlivé výsledky jednoduchou amplifikací templátu a měřením množství získaného produktu, protože neexistuje jednoduchý a spolehlivý vztah mezi počátečním množstvím templátu a množstvím vytvořeného produktu, pokud polymerázová řetězová reakce neprobíhá opravdu exponenciálně. Exponenciální průběh reakce je narušen v okamžiku, kdy se nedostává některé z reagensů. Tento problém lze do jisté míry překonat přidáním známého množství druhého templátu, který je téměř stejný jako templát původní, amplifikovatelný identickou sadou primerů, ale odlišitelný po gelové elektroforéze. Obvykle se tento pomocný templát připravuje tak, že se do plazmidového vektoru naklonuje produkt PCR a delecí se jeho malá část odstraní. Přidáním známého množství modifikovaného templátu DNA do PCR a porovnáním relativních množství obou vzniklých amplifikátů lze dosáhnout mnohem větší přesnosti při kvantifikaci produktu. V praxi však tento přístup byl v poslední době nahrazen přesnější a jednodušší metodou PCR v reálném čase.

RT-PCR V REÁLNÉM ČASE. Jak je zmíněno výše, není spolehlivá korelace mezi počátečním množstvím templátu a konečným množstvím produktu PCR při pevném počtu cyklů. Jako spolehlivější se jeví vztah mezi množstvím templátu a počtem amplifikačních cyklů nutných pro vytvoření detekovatelného produktu. Teoreticky by bylo možné sestavit různé amplifikační reakce, zastavit je po různém počtu cyklů a analyzovat, které reakce poskytnou detekovatelný produkt. Tento postup by byl pracný a nákladný. Situace by se však podstatně zjednodušila, pokud by existoval způsob jak detekovat přítomnost produktu, aniž by se amplifikační reakce musely přerušovat. Právě to je základem PCR v reálném čase.

Pro provedení PCR v reálném čase je proto nutné mít způsob, jak zjistit přítomnost produktu reakce v okamžiku jeho vzniku, a nikoliv až po zastavení reakce a provedení gelové elektroforézy. Nejjednodušším způsobem jak tento problém vyřešit je přidání takového barviva do směsi PCR, které fluoreskuje po navázání na dvouřetězcovou DNA. Tento přístup však má své slabiny spočívající v tvorbě falešných signálů, jakmile se barvivo naváže na chybný produkt reakce. Vyšší specifity lze proto dosáhnout použitím sond, které se vážou pouze na specifický produkt.

Pokud se PCR provádí ve speciálním přístroji, který nejen umožňuje provádět cyklické změny teplot, ale také detekci fluorescence, lze monitorovat postup PCR v reálném čase – vznik produktu v průběhu PCR. Nejprve je templát jednořetězcový a proto přístroj nezaznamená žádný signál. Při pokračující amplifikaci se vytvoří dvouřetězcový produkt, který emituje fluorescenční signál (obr. 80). Za předpokladu, že se vytvoří adekvátní množství produktu a hladina fluorescence je dostatečná, přístroj signál zachytí. V průběhu dalších cyklů se míra emitované fluorescence bude dále zvyšovat. Extrapolací vzniklé křivky zpět k nule lze určit počet cyklů nutných pro vytvoření detekovatelného množství produktu. Tato hodnota, označovaná jako C_T , závisí na prvotním množství templátu: čím je vyšší množství prvotního templátu, tím je nižší hodnota C_T . Na obr. 88 vzorek A poskytuje detekovatelný signál po 20 cyklech a jeho hodnota C_T je proto 20. Tomu odpovídá větší množství templátu než u vzorků B ($C_T=22$) a C ($C_T=25$).



Obr. 80 PCR v reálném čase

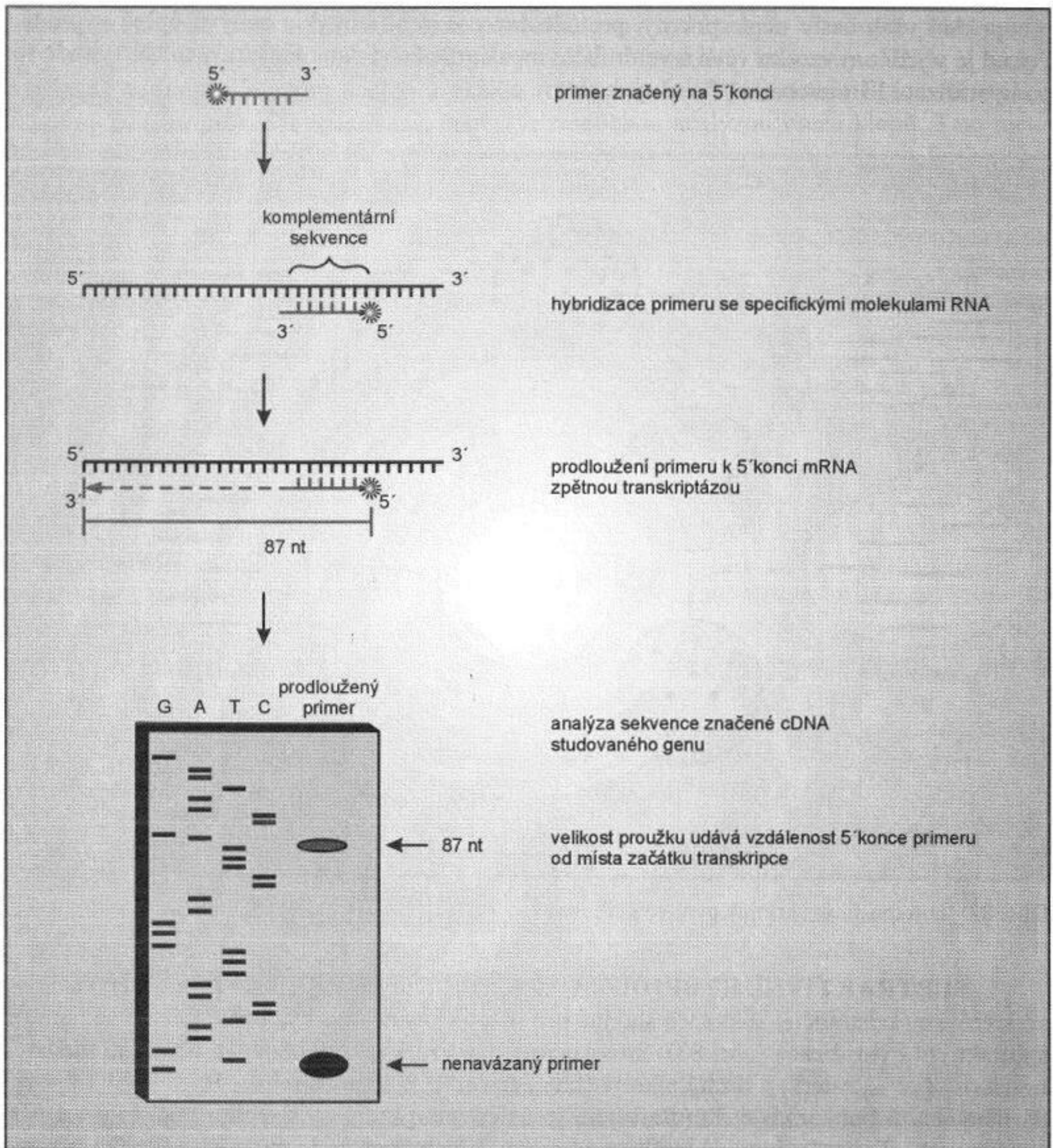
Při srovnávání hladiny mRNA v různých vzorcích je třeba zajistit, aby množství vstupního materiálu (počet buněk, celkové množství mRNA) bylo vždy stejné. Standardizace podle množství celkové RNA není zcela spolehlivá, protože obsah ribozomální RNA v buňce může velmi kolísat. Nejpřesnějším způsobem standardizace reakcí je použití paralelní RT-PCR pro amplifikaci pomocného genu, o kterém je známo, že se exprimuje konstitutivně, nebo alespoň nemění míru své exprese za testovaných podmínek. Tímto způsobem pak lze vymezit rozdíly v úrovni exprese určitých genů za různých podmínek. RT-PCR v reálném čase je rovněž důležitá metoda pro kvantitativní detekci určitých sekvencí DNA a pro identifikaci specifických změn v sekvenci DNA včetně takových, které mají diagnostický význam v medicíně.

HYBRIDIZACE *IN SITU*. Hybridizace *in situ* představuje vedle hybridizace prováděné v roztoku a na membránách třetí variantu této metody. Hledaná sekvence (DNA nebo RNA) je v tomto případě imobilizována uvnitř buňky v mikroskopickém preparátu. V případě, že cílovou sekvencí je DNA, je obvykle smyslem této metody chromozomální mapování genů. Po hybridizaci značené sondy s buněčnými metafázovými chromozomy a specifickém barvení lze sondou lokalizovat hledaný gen do určité oblasti určitého chromozomu. V případě, že cílovou sekvencí je RNA, lze touto metodou např. identifikovat v tkáňovém řezu buňky, které aktivně transkribují určitý gen. Hybridizaci *in situ* lze rovněž využít pro detekci virů. V tomto případě je cílem buď DNA nebo RNA v závislosti na typu viru. Northernový přenos, test ochrany před RNázou a RT-PCR nám umožňují zjistit v jaké tkáni se exprimuje daná mRNA. Hybridizací *in situ* lze získat ještě přesnější informaci o tom, která buňka exprimuje danou mRNA. V tom spočívá její hlavní výhoda. Naopak nevýhodou této metody je obtížnost získání kvantitativních údajů o míře exprese daného genu.

TEST PRODLOUŽENÍ PRIMERU „PRIMER EXTENSION ASSAY“. Při studiu genové exprese může být zajímavé nejen zjištění do jaké míry se tvoří specifický transkript, ale také, kde přesně začíná a končí. Analýza 3'-konců eukaryotických molekul mRNA obvykle není problém. Většina cDNA knihoven se připravuje s použitím primerů oligo(dT), které se vážou na poly-A úseky mRNA a tím je zajištěno, že tato část molekuly mRNA je pro syntézu cDNA vždy využita. Naopak 5'-konec mRNA nebývá vždy přepsán do cDNA. Zpětná transkripce nemusí proběhnout až na samotný 5'-konec templátu mRNA. Důvodem může být částečná degradace templátu, přítomnost sekundárních struktur nebo proteinů, které RNA vážou a zastavují zpětnou transkriptázu. Test prodloužení primeru se používá pro přesné mapování 5'-konce mRNA. Ze vzorku tkáně nebo suspenze buněk, o kterých je známo, že daný gen účinně exprimují, se izoluje mRNA. Získaná směs různých molekul mRNA se smísí s radioaktivně značenými oligonukleotidy s funkcí primeru, které jsou specifické pro studovaný transkript a zároveň komplementární k oblasti sousedící s 5'-koncem dané sekvence. Zpětná transkripce pak zajistí prodloužení primeru až k samému 5'-konci mRNA, kde polymerační reakce automaticky skončí. Vzniklý radioaktivní řetězec cDNA se nanese na sekvenační gel, na který se v paralelních drahách nanesou také produkty sekvenačních reakcí stejného genu, které vycházejí ze stejného primeru. Tímto způsobem lze identifikovat začátek transkripce s přesností na jeden nukleotid (obr. 81). Pokud se použijí fluorescentní značky, lze popsanou techniku přizpůsobit pro automatické sekvencování.

2. Srovnání transkriptomů

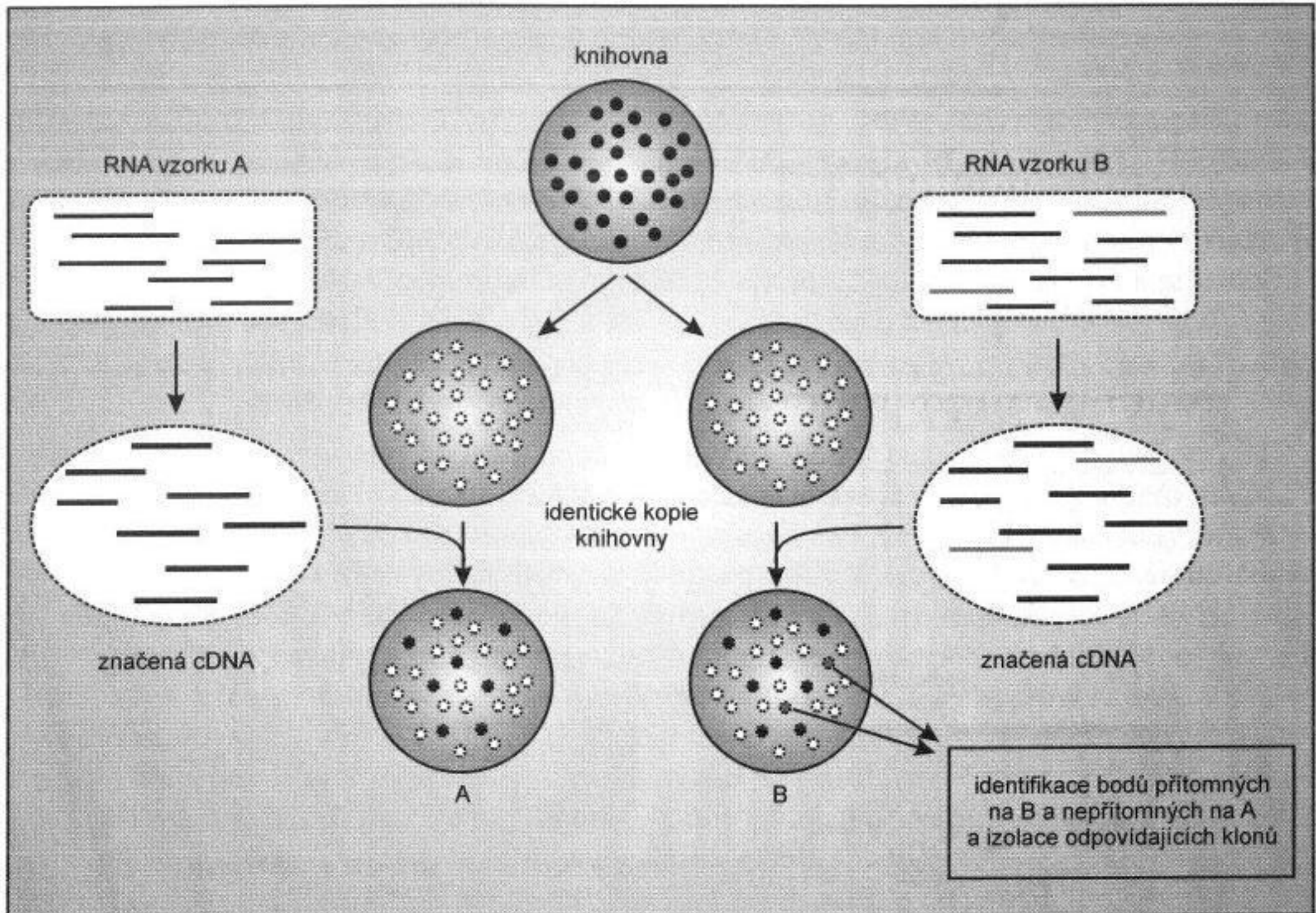
Metody typu northernového přenosu jsou vhodné pro srovnání expresních profilů omezeného počtu genů. Proto se northernový přenos úspěšně používal a používá pro identifikaci genů v rámci skupiny již dříve známých kandidátních genů, které zodpovídají za určité choroby. Obvyklým badatelským cílem je identifikace (1) genů, které se exprimují v jednom organismu a ne v druhém, (2) genů s tkáňově specifickou expresí nebo (3) genů, jejichž exprese se mění v závislosti na vnějších podmínkách. Pro srovnání molekul mRNA exprimovaných v různých vzorcích bylo vypracováno několik technik, které jsou popsány v následujících odstavcích. Tyto metody mohou pomoci zodpovědět některé velmi důležité otázky, například určit, které geny se v různé míře exprimují ve zdravé a nemocné tkáni a mohou se podílet na vzniku dané choroby. Některé z těchto metod byly překonány zavedením čipových hybridizačních technik (DNA-array), ale jiné jsou stále široce používány.



Obr. 81 Určení 5'-konce mRNA metodou prodloužení primeru

DIFERENCIÁLNÍ SKRÍNINK. Nejjednodušší metodou identifikace genů, které se exprimují s odlišnou účinností, je diferenciální skrínink genové knihovny (obr. 82). Skrínink se provádí na dvou identických filtrech, obsahujících otisky DNA genové knihovny, které byly získány buď opakovaným přenosem ze stejné misky nebo přenosem ze dvou stejných misek vzniklých „razítkováním“. Každá z těchto identických knihoven je podrobena skríninku jinou sondou. První sonda se připraví zpětnou transkripcí směsi mRNA izolované z jednoho porovnávaného vzorku a druhá se připraví stejným způsobem z druhého porovnávaného vzorku. Přítomnost radioaktivně značených nukleotidů zajistí, že obě sondy budou značené. Klony, které vykazují po hybridizaci pozitivní signál s jednou, ale ne s druhou sondou, obsahují potenciální geny s odlišnou úrovní exprese. Tento postup předpokládá, že v jednom vzorku specifický transkript není vůbec přítomen (vzorek A na obr. 82). Takový

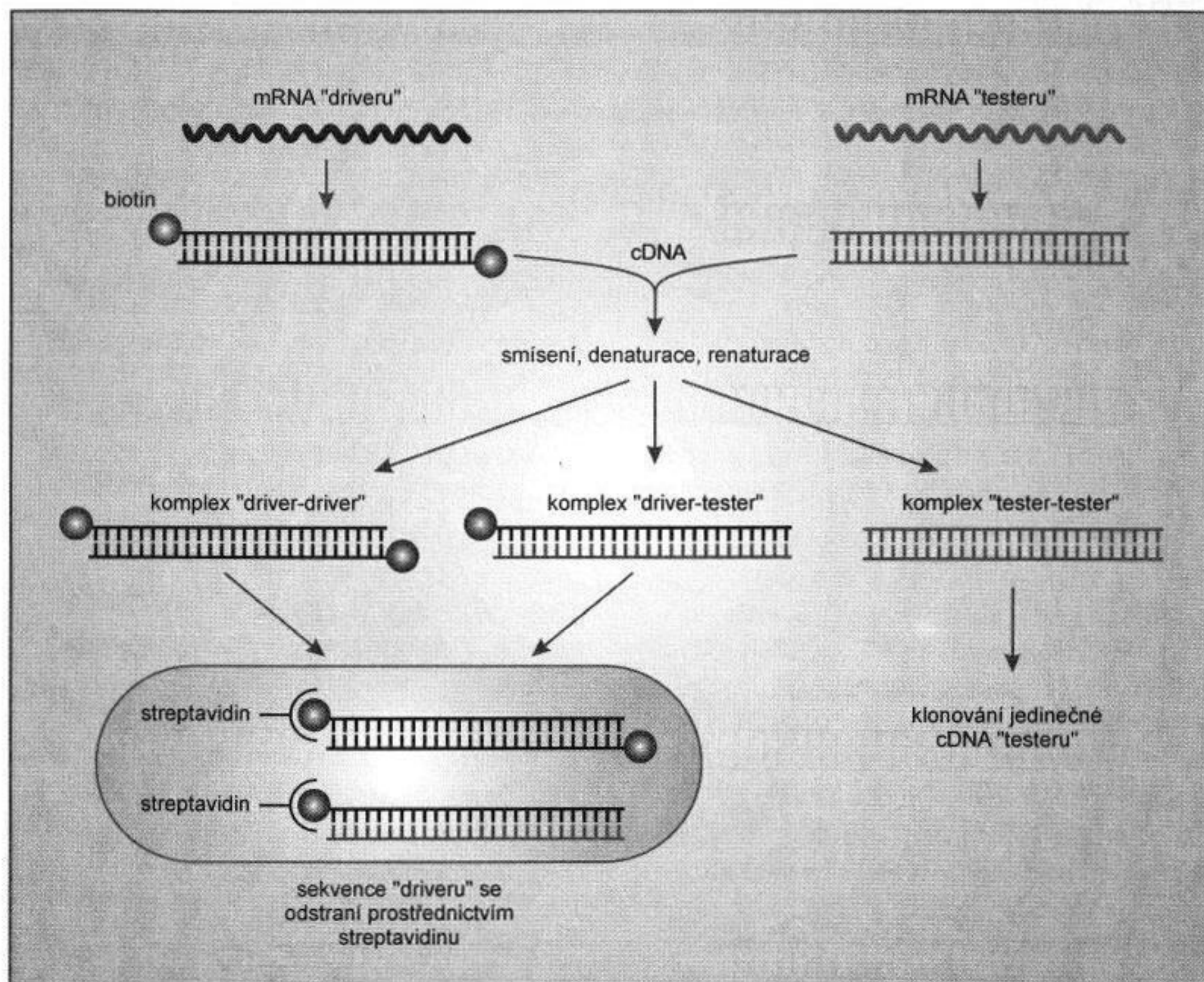
předpoklad však často není správný, protože exprese genů obvykle nebývá úplně vypnuta. Pokud je v jednom vzorku větší a ve druhém menší množství dané molekuly mRNA, bude se po hybridizaci lišit intenzita příslušných skvrn.



Obr. 82 Diferenciální skrínink genové knihovny

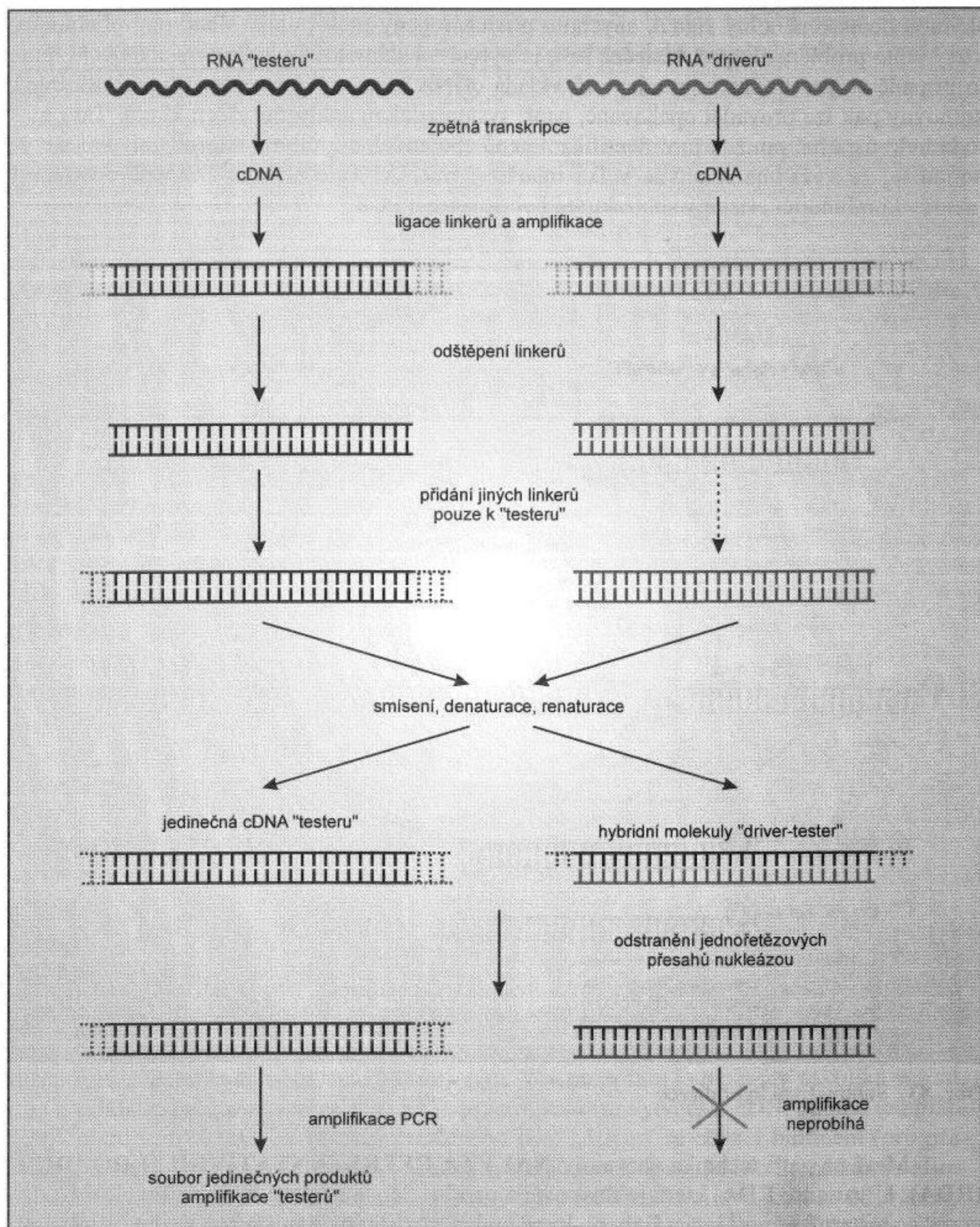
SUBTRAKTIVNÍ HYBRIDIZACE. Alternativní postup spočívá ve změně sondy, ze které jsou odstraněny sekvence shodné pro oba testované vzorky. Tento postup se nazývá subtraktivní hybridizace (obr. 83). Srovnáváme dva vzorky, z nichž jeden obsahuje hledaný transkript (tzv. „tester“) a druhý nikoliv (tzv. „driver“). Předpokládejme, že „driver“ odpovídá nemocným buňkám a naším úmyslem je nalézt gen, který se v těchto buňkách nemůže exprimovat. „Tester“ odpovídá buňkám zdravým. Vlastní postup je možný v několika variantách. V příkladu znázorněném na obr. 83 je prvním krokem vytvoření cDNA podle templátu mRNA obou vzorků. cDNA vzorku označeného jako „driver“ se označí biotinem (pro přehlednost je na obr. 83 použito koncové značení). Vzhledem k tomu, že biotin má silnou afinitu k streptavidinu, mohou být všechny molekuly s navázaným biotinem snadno odstraněny. V dalším kroku se smísí nadbytek cDNA „driveru“ značené biotinem s cDNA „testeru“ a provede se jejich denaturace a následná renaturace. Všechny molekuly cDNA „testeru“, které jsou komplementární cDNA „driveru“ vytvoří hybridní molekuly, které mohou být vzhledem k přítomnosti biotinem označeného řetězce cDNA „driveru“ odstraněny streptavidinem. Zároveň se tímto krokem odstraní dvouřetězcová DNA vzniklá renaturací řetězců cDNA „driveru“. Směs cDNA, která není označena biotinem a zůstává ve vzorku, je obohacena o ty molekuly cDNA „testeru“, které jsou jedinečné, tj. nejsou přítomny v populaci cDNA „driveru“. Tuto směs lze následně použít jako sondu pro skrínink genové knihovny. Nevýhodou tohoto postupu je, že vzácné transkripty, které mohou být důležité, pravděpodobně nepo-

skytnou dostatečně silný signál, abychom příslušné geny mohli najít. Vhodným přístupem, který tento problém alespoň částečně řeší, je vytvoření subtraktivní knihovny cDNA. V tomto případě se prostřednictvím adaptorů vkládá cDNA „testeru“ do vektoru ligací. Skríning knihovny pak lze provádět opakovaně, např. systematickou analýzou všech klonů. Tato metoda bylo úspěšně použita pro identifikaci genů spojených s určitými chorobami. Její nevýhodou je, že vyžaduje relativně velká množství mRNA. Tuto slabinu částečně odstraňují metody kombinující přístupy subtraktivní hybridizace a PCR.



Obr. 83 Subtraktivní hybridizace

Mezi ně patří technika nazvaná **ANALÝZA REPREZENTATIVNÍCH ROZDÍLŮ (RDA)**. U varianty RDA, která je ilustrována na obr. 84, se nejprve ke koncům cDNA „driveru“ a „testeru“ připojí ligací linkery, které budou představovat místa pro vazbu primerů při PCR. Po odstranění původních linkerů z produktu PCR se použije jiný pár linkerů, který se připojí pouze k produktu PCR „testeru“ a ne „driveru“. Po smísení a hybridizaci velkého nadbytku produktu amplifikace „driveru“ s produktem „testeru“ budou vznikat hybridní molekuly z těch jednořetězců (obou vzorků), které jsou vzájemně komplementární. Pouze jedinečné řetězce „testeru“, které nemohou hybridizovat s nadbytkem DNA „driveru“ budou tvořit specifické hybridy „tester-tester“, které lze amplifikovat následnou PCR, kdy se jako primery použijí sekvence komplementární ke specifickým linkerům „testeru“. Amplifikace hybridů „driver-driver“ není možná, protože templát postrádá místa pro vazbu těchto primerů. Hybridní molekuly „driver-tester“ mají nespárované konce, protože linkery byly přidány



Obr. 84 Analýza reprezentativních rozdílů

pouze k „testeru“ a mohou být odstraněny nukleázou specifickou pro jednořetězovou DNA. Amplifikace ani těchto molekul polymerázovou řetězovou reakcí proto nebude možná.

DIFERENCIÁLNÍ DISPLAY. Diferenciální display je metoda založená na PCR, kterou lze srovnat dvě populace cDNA. Jeden z primerů je připraven tak, aby se vázal na poly-A konec mRNA a druhý tak, aby se vázal na mRNA náhodně. Polymerázovou řetězovou reakcí prováděnou při velmi nízké připojovací teplotě se amplifikuje část molekul cDNA

přítomných ve vzorku, které se podrobí elektroforéze v polyakrylamidovém gelu. Pokud se provedou polymerázové řetězové reakce za stejných podmínek u dvou různých vzorků, lze po elektroforéze nalézt ty druhy cDNA, které se u obou vzorků vyskytují v různé míře, vyjmout je z gelu, znovu amplifikovat a sekvencovat. Pokud se jedná o dosud nepopsané sekvence, lze identifikaci genu provést skrininkem knihovny nebo technikou RACE (str. 91).

Přítomnost těchto druhů cDNA ve směsi amplifikovaných molekul je náhodná a vyplývá ze stupně příbuznosti její sekvence se sekvencí primerů, tj. samotná metoda nezajistí preferenční amplifikaci transkriptů syntetizovaných ve srovnávaných vzorcích s různou účinností. Proto je třeba pracovat s různými kombinacemi primerů a je málo pravděpodobné, že by tento typ analýzy mohl poskytnout úplný seznam diferencielně exprimovaných genů. Nicméně tato metoda má své specifické výhody: vychází z malého množství výchozího materiálu a nevyklučuje zachycení i velmi vzácných transkriptů. V současné době se však častěji používá RDA nebo technologie DNA čipů.

METODY ZALOŽENÉ NA TECHNOLOGII DNA ČIPŮ („DNA MICRO-ARRAYS“). Techniky typu subtraktivní hybridizace umožnily hledání produktů genů s odlišnou mírou exprese. Častým cílem je nalezení genu, jehož aberantní exprese přímo souvisí se vznikem určité choroby. Northernový přenos nebo RT-PCR mohou být užitečné při studiu exprese jednoho nebo několika málo genů splňujících daná kritéria, ale tyto metody nejsou vhodné pro analýzu velkého počtu genů. Ještě důležitější je fakt, že jejich použití je omezeno pouze na geny, které jsou již popsány. Vzhledem k rychlému vývoji sekvenčních technik je možné si klást nejen specifické, ale také globálnější otázky, jako např. jaké je celkové spektrum genů exprimovaných za určitých podmínek a ne za jiných.

K tomuto problému můžeme přistoupit použitím metod založených na DNA čipech („DNA microarrays“), které byly popsány v kapitole věnované metodám analýzy genomu. V tomto případě se sondy DNA, reprezentující část nebo celý genom daného organismu, imobilizují kovalentní vazbou na skleněnou destičku a použijí k hybridizaci s fluorescenčně značenou cDNA izolovanou z kontrolního vzorku (zelená fluorescenční značka) a zároveň ze vzorku testovaného (červená fluorescenční značka). Imobilizace sond na podložní sklíčko se provádí ve speciálním zařízení tak, aby vazba vydržela vysoké teploty nutné pro následnou hybridizaci. Detekci fluorescence po hybridizaci zajišťuje konfokální laserový skener, spojený s počítačem, který provede analýzu dat. Sondy, které hybridizují s cDNA a fluoreskují červeně, reprezentují geny, které jsou specificky exprimovány v testovaném vzorku. Sondy, které hybridizují s cDNA a fluoreskují zeleně, reprezentují geny, které se specificky exprimují v kontrolním vzorku. Sondy, které hybridizují s cDNA a fluoreskují žlutě, reprezentují geny, které se exprimují v kontrolním i testovaném vzorku. Protože lze připravit mnoho identických kopií destiček s imobilizovanou sondou, je možné tuto techniku použít pro testování přítomnosti mnoha specifických molekul cDNA v buňkách rostoucích za různých podmínek. Z koncepčního hlediska se popsaný přístup neliší od diferencielního skrininku. Subtraktivní knihovny cDNA v plazmidových vektorech byly často pracně testovány klon za klonem. Nástup robotizace a elektronické analýzy obrazu nejen usnadnil technickou přípravu DNA čipů, ale také eliminoval požadavek na přípravu čipů pouze pro nevelkou populaci obzvláště zajímavých transkriptů. Znalost úplné sekvence genomu daného organismu navíc umožňuje vytvořit čipy z malých fragmentů DNA (buď syntetizovaných nebo amplifikovaných PCR), kterými lze identifikovat všechny možné otevřené čtecí rámce. Čipy pro úplný genom jsou v současné době k dispozici pro některé bakteriální kmeny a prvoky. Vedle technologie DNA čipů založených na hybridizacích molekul DNA-DNA nebo DNA-RNA, existují rovněž proteinové čipy („protein microarrays“), vypracované pro analýzu meziproteinových interakcí.

Čipy EST („expressed sequence tag“). Nejjednodušším způsobem, jak vytvořit cDNA „čip“, je vyšetřit knihovnu klonů cDNA určité tkáně a testovat klony jeden po druhém. Tento přístup má své nevýhody: (1) jeho použitelnost je omezena pouze pro původní tkáň, protože v jiných tkáních mohou expresní profily vypadat jinak; (2) i když se knihovna cDNA zbaví sekvencí rRNA a tRNA tím, že se založí na matrici poly-A-mRNA, bude stále obsahovat velké množství opakujících se sekvencí. Je to způsobené tím, že na rozdíl od genomové knihovny je frekvence daného genu v knihovně cDNA dána mírou jeho exprese. V knihovně cDNA jsou proto ve velké převaze strukturní geny, provozní („housekeeping“) geny a geny specifické pro danou tkáň. Oba zmíněné nedostatky řeší čipy EST. Klony EST jsou klony cDNA z knihoven buněk různých tkání, které byly testovány jeden po druhém s využitím robotu. Každá z těchto molekul cDNA byla charakterizována jednorázovým sekvencováním od jednoho konce, takže vznikla databáze koncových značek cDNA, která je archivována a dostupná v GenBank při hledání sekvencí příbuzných genu, který studujeme. Systematickou počítačovou analýzou byly nalezeny jedinečné klony cDNA, které lze využít pro vytvoření čipů cDNA zbavených nadbytečných opakujících se sekvencí. Nakapáním těchto vzorků na membránu (tzv. „DNA-macroarray“, makročip) nebo sklíčko (tzv. „DNA-microarray“, mikročip) vzniká systém umožňující současné studium většiny genů lidského, myšičího a krysího genomu. Pokud se připraví dva identické čipy, které se použijí ke skríninku značených populací cDNA „driveru“ a „testeru“, lze jednorázovým experimentem získat více výsledků než několikaměsíční prací technikou „diferenciální display“.

Využití PCR pro přípravu čipů. Pro bakterie sice nejsou k dispozici čipy EST, ale znalost úplné sekvence genomu několika bakterií umožňuje použít ještě účinnější systém přípravy čipů. Nejprve se s využitím počítačů určí všechny otevřené čtecí rámce dosahující alespoň určité minimální velikosti, které reprezentují předpokládané geny. Pro každý z nich se připraví dvojice primerů, prostřednictvím kterých lze amplifikovat část tohoto genu o vhodné velikosti. Amplifikované fragmenty DNA se využijí pro přípravu makročipů nebo mikročipů.

Charakteristika hybridizací prováděných na čipech. Způsob provedení hybridizace na čipech je opačný ve srovnání s klasickou hybridizací typu Southernova přenosu. U klasických technik je studovaná DNA (nebo RNA) imobilizována na filtr a zde podrobena hybridizaci se specifickou značenou sondou. U makro- a mikročipů jsou k pevnému podkladu upevněny neznačené specifické fragmenty (sondy) a ty jsou hybridizovány se značenou cílovou molekulou.

Technologie čipů je velmi nákladná. Nejenže vyžaduje pořízení nákladné přístrojové techniky, ale také syntéza velkého počtu primerů i vlastní provedení PCR, jsou drahé. Jakmile je však příprava čipu ukončena, jsou další kroky podstatně levnější. Je výhodné, že lze snadno připravit mnoho kopií téhož čipu a že provedení hybridizace a odečtení výsledků je podstatně levnější. Zvláště v případě makročipů je vyhodnocení výsledků jednoduché, protože není nutné speciální zařízení pro analýzu obrazu.

Ve všech variantách diferenciální a subtraktivní hybridizace a skríninku se objevují artefakty a nepřesnosti. Je pravděpodobné, že tyto metody nikdy zcela nenahradí klasické hybridizační metody, které budou stále nutné pro jednoznačné potvrzení údajů získaných technologií čipů a pro získání informací o odpovídajících transkriptech.

3. Analýza promotorů a interakcí protein – DNA

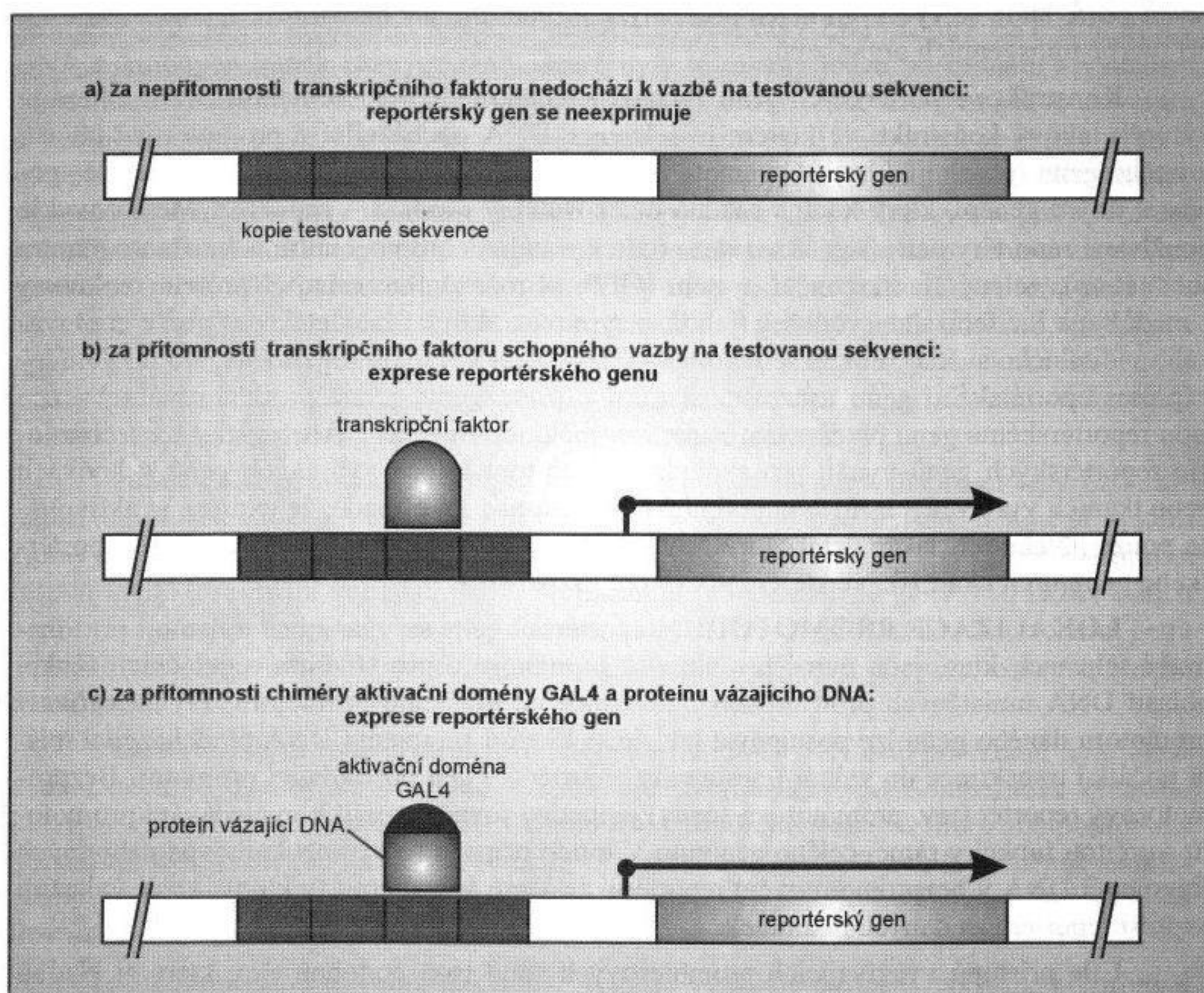
REPORTÉRSKÉ GENY. V mnoha případech při analýze genové exprese selhávají i nejpropracovanější metodické přístupy, které byly popsány v předchozí kapitole. Například při studiu buněčné diferenciaci v mnohobuněčném organismu si můžeme klást otázku, ve kterých buňkách nebo tkáních se určité geny začínají exprimovat, a ve které fázi vývoje k tomuto dochází. Jednou z možností, jak tomuto problému přistoupit, je využít *reportérských genů*, které se využívají nejen při analýze promotorů, ale také transkripčních faktorů a při tvorbě transgenních organismů.

Konstrukce reportérských genů vychází z technologie rekombinantní DNA. Cílem je vytvořit takový konstrukt, ve kterém je sekvence DNA pocházející z promotorové oblasti určitého genu (obsahující kromě promotoru také potenciální regulační sekvence), uměle spojena s jiným genem, který kóduje snadno detekovatelný produkt – **reportér**. Mezi obvykle používané reportéry patří β -galaktozidáza (detekovatelná chromogenním nebo fluorogenním substrátem), zelený fluorescenční protein (GFP, přirozeně fluoreskující protein izolovaný z medúzy) a luciferáza ze světlušek (jehož enzymovou aktivitu lze detekovat podle emitovaného viditelného světla). Pokud se reportérský konstrukt vnese do organismu, lze podle míry exprese reportérského genu usuzovat na míru exprese genu, jehož promotorové sekvence jsou reportérskému genu předřazeny, např. v průběhu diferenciaci. Analogicky lze technologii reportérských genů využít pro studium úrovně transkripce vybraných genů v buňkách nebo tkáních vystavených různým podmínkám. Dokonce i v případě, že exprese je aktivována pouze přechodně, takže detekce mRNA je ztížena, lze vzhledem k větší stabilitě reportérského genu určit okamžik, ve kterém je exprese aktivována.

LOKALIZACE PROMOTORU. Reportérské geny se významně uplatňují při lokalizaci sekvencí, které jsou nutné pro aktivitu promotoru a pro studium regulačních funkcí oblastí DNA umístěných proti proudu transkripce od vlastního promotoru. Při identifikaci promotoru daného genu lze postupovat tak, že se klonují fragmenty DNA předcházející místu počátku transkripce do vektoru nesoucího reportérský gen postrádající promotor. Bezpromotorový reportér (tzv. promotorová sonda) je možno rovněž využít k vyhledávání promotorů s určitou funkcí v rámci celého genomu. V tomto případě se vytvoří knihovna náhodných fragmentů DNA v bezpromotorovém reportéru, ze které se vyberou ty klony, které vykazují expresi reportéru za daných podmínek.

Cíle přístupů využívajících promotorových sond jsou podobné těm, které si kladou studie genové exprese založené na technologii mikročipů. Jediný rozdíl mezi oběma přístupy spočívá v cílové molekule: zatímco mikročipy studují hladiny mRNA, promotorové sondy testují aktivitu promotoru. Oba přístupy se v určitém smyslu doplňují. Mikročipy slouží k přímé identifikaci zřetelně se exprimujících genů, zatímco promotorové sondy jsou úspěšnější při detekci přechodné a slabé aktivity promotorů. Promotorové sondy mají navíc výhodu v tom, že vycházejí z náhodných fragmentů DNA a jejich použití nevyžaduje znalost sekvence genomu. Jakmile se získají pozitivní klony, je však nutné daný fragment identifikovat. Vážnou nevýhodou reportérských systémů je, že nelze vyloučit možnost, že fragmenty DNA umístěné mimo svůj přirozený kontext, mohou vykazovat odlišné účinky na proces iniciace transkripce. Některé promotory nefungují správně, pokud jsou umístěny v plazmidu a naopak některé fragmenty DNA, které poskytují pozitivní signály v promotorových sondách, nefungují při následných testech jako reálné promotory. Reportérské geny poskytují spolehlivější výsledky tehdy, jsou-li umístěny v chromozomu a nikoli v umělém prostředí plazmidu.

IDENTIFIKACE PROMOTOROVÝCH REGULAČNÍCH ELEMENTŮ A PROTEINŮ VÁŽOUCÍCH DNA. Nejpřesnější metodou lokalizace promotorových sekvencí, stejně jako jiných sekvencí DNA, které tím, že představují vazebná místa pro specifické proteiny, ovlivňují transkripci, je ověření jejich schopnosti interagovat s příslušnými proteiny. K tomuto účelu slouží kvasinkové „jednohybridní“ testy, stopování DNázou I („DNase I footprinting“) a gelová zpomalovací analýza („gel retardation assay“).

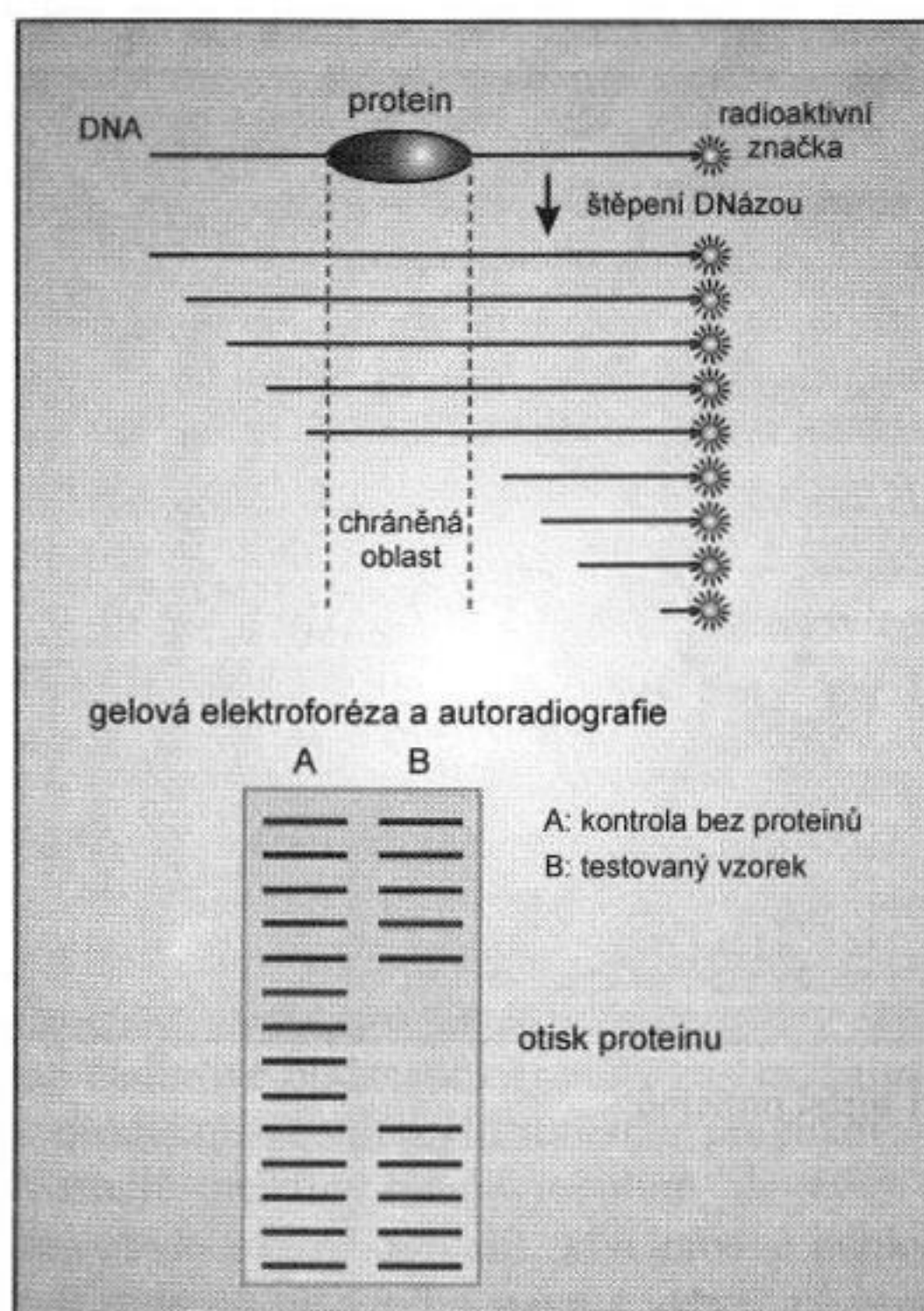


Obr. 85 Kvasinkový jednohybridní systém

Kvasinkové jednohybridní testy. Cílem kvasinkového jednohybridního systému je identifikace proteinů, které interagují s definovanou sekvencí DNA nebo naopak lokalizace oblastí DNA, které vážou známé transkripční faktory. Postupuje se tak, že se zkoumané nukleotidové sekvence začlení proti proudu transkripce od reportérského genu. Vzniklý konstrukt se pak včlení do kvasinkového genomu. Za nepřítomnosti transkripčních faktorů, které mají vazebnou afinitu k testované sekvenci, se reportérský gen exprimovat nebude (obr. 85a). Pokud se však rekombinantní kvasinkový kmen transformuje cDNA pocházející z expresní knihovny a vzniknou klony, které daný transkripční faktor vytvoří, dojde k jeho interakci s testovanou sekvencí a aktivaci transkripce reportérského genu (obr. 85b). Použití tohoto systému může být rozšířeno na další proteiny vzhledem k tomu, že eukaryotické transkripční faktory mají duální povahu. Obecně platí, že se skládají ze dvou domén: jedna doména zajišťuje specifický kontakt s určitými sekvencemi DNA (DNA-vazebná doména),

druhá zodpovídá za aktivaci transkripce (aktivační doména). Tyto domény lze od sebe oddělit, aniž by tím byla jejich funkce ovlivněna. Lze proto spojit aktivační doménu jednoho proteinu s DNA-vazebnou doménou jiných proteinů. Vzniklá proteinová chiméra bude aktivovat transkripci jiných genů podle specifity nové DNA-vazebné domény. Nejlepším příkladem je kvasinkový aktivátor GAL4, který zodpovídá za transkripci genů zapojených do metabolismu galaktózy. Po odstranění DNA-vazebné domény proteinu GAL4 a jejím nahrazení jinou DNA-vazebnou doménou, bude hybridní protein aktivovat transkripci jiné sady genů. Této vlastnosti lze využít při tvorbě knihovny cDNA s využitím speciálního vektoru obsahujícího sekvenci kódující aktivační doménu GAL4. V této knihovně budou produkty exprimovány v podobě proteinových chimér. Pokud se budou vázat na testovanou sekvenci, aktivační doména GAL4 bude aktivovat transkripci reportérského genu (obr. 85c). Protože transkripci zajistí aktivační doména GAL4, tento systém dokáže detekovat široké spektrum proteinů schopných vazby na DNA a nejen transkripční faktory. Vylepšenou verzi tohoto přístupu představuje kvasinkový dvouhybridní systém, který se používá pro studium interakcí mezi proteiny (str. 148).

Stopování DNázou I („DNase I footprinting“). Metoda stopování DNázou I (nebo jen stopování) slouží k identifikaci té části testovaného promotoru, která představuje vlastní vazebné místo pro transkripční faktor. Z jader izolovaných z příslušných buněk se nejprve purifikují proteiny. Tato směs, nebo z ní dále purifikovaný specifický protein, se smísí s fragmentem DNA, který je předmětem analýzy. Paralelně se sestaví kontrolní reakce, ve které není zastoupen žádný protein. V obou reakcích je DNA radioaktivně značena na 3'-konci. Následně se do obou reakcí přidá nukleáza DNáza I, která rozštěpí všechny fosfodiesterové vazby ve všech řetězcích DNA, ke kterým se dostane. Podmínky štěpení se však

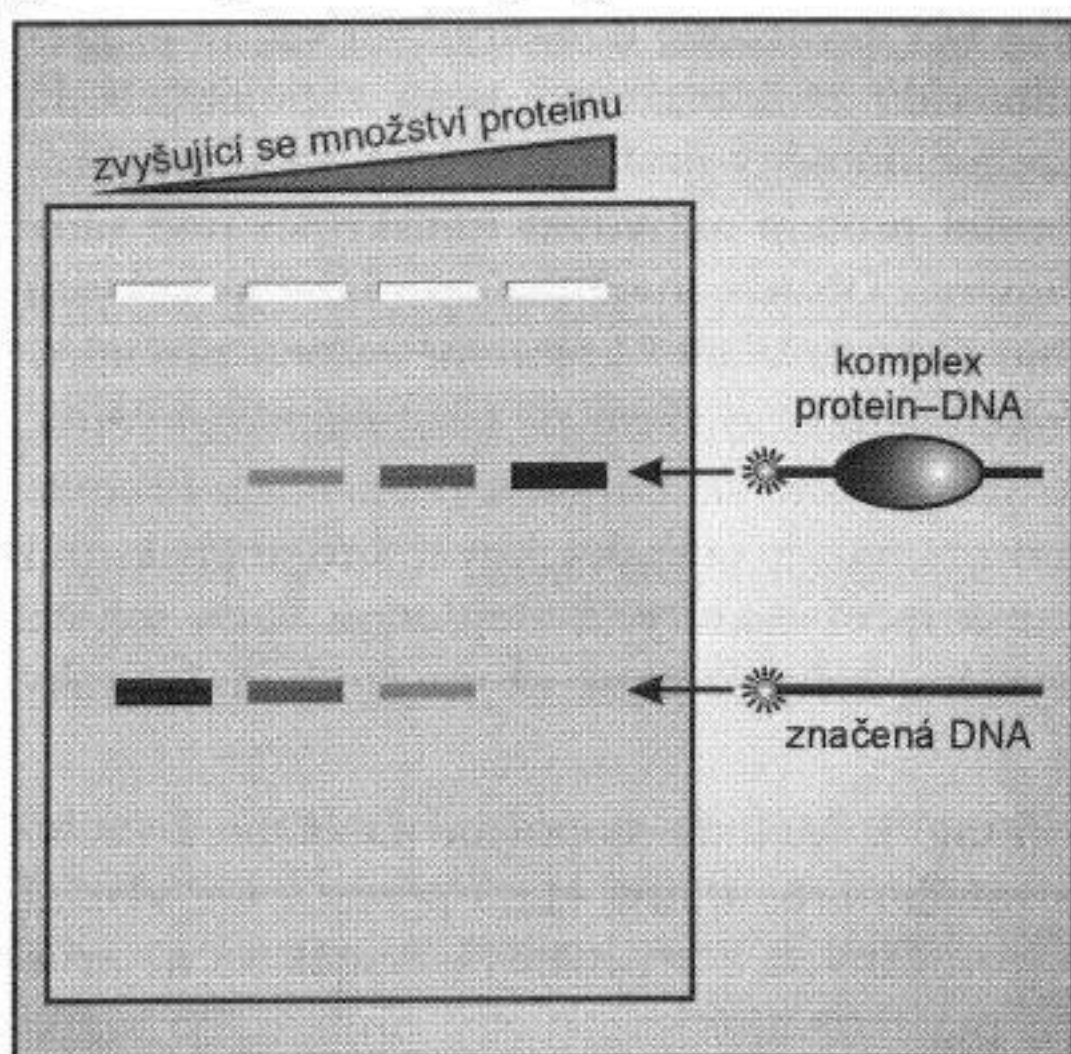


Obr. 86 Stopování DNázou I

nastaví tak, aby reakce nemohla proběhnout úplně: jejím výsledkem v kontrolním vzorku bude náhodná fragmentace DNA do podoby žebříčku, ve kterém se budou vyskytovat fragmenty všech velikostí od neštěpené původní DNA, až po jednu bázi. Ve vlastním testovaném vzorku však DNáza I nebude mít přístup ke svému substrátu v těch místech, ve kterých byla DNA chráněna navázaným proteinem. Pokud se tyto dva vzorky nanášou na sekvenační gel a podrobí elektroforéze, je možné vymezit oblasti, ve kterých je pravidelné rozdělení fragmentů DNA kontrolního vzorku přerušeno – tzv. otisk proteinu. Tyto oblasti odpovídají chráněným oblastem DNA, na kterých v důsledku navázání proteinu nedošlo k fragmentaci DNA nukleázou (obr. 86).

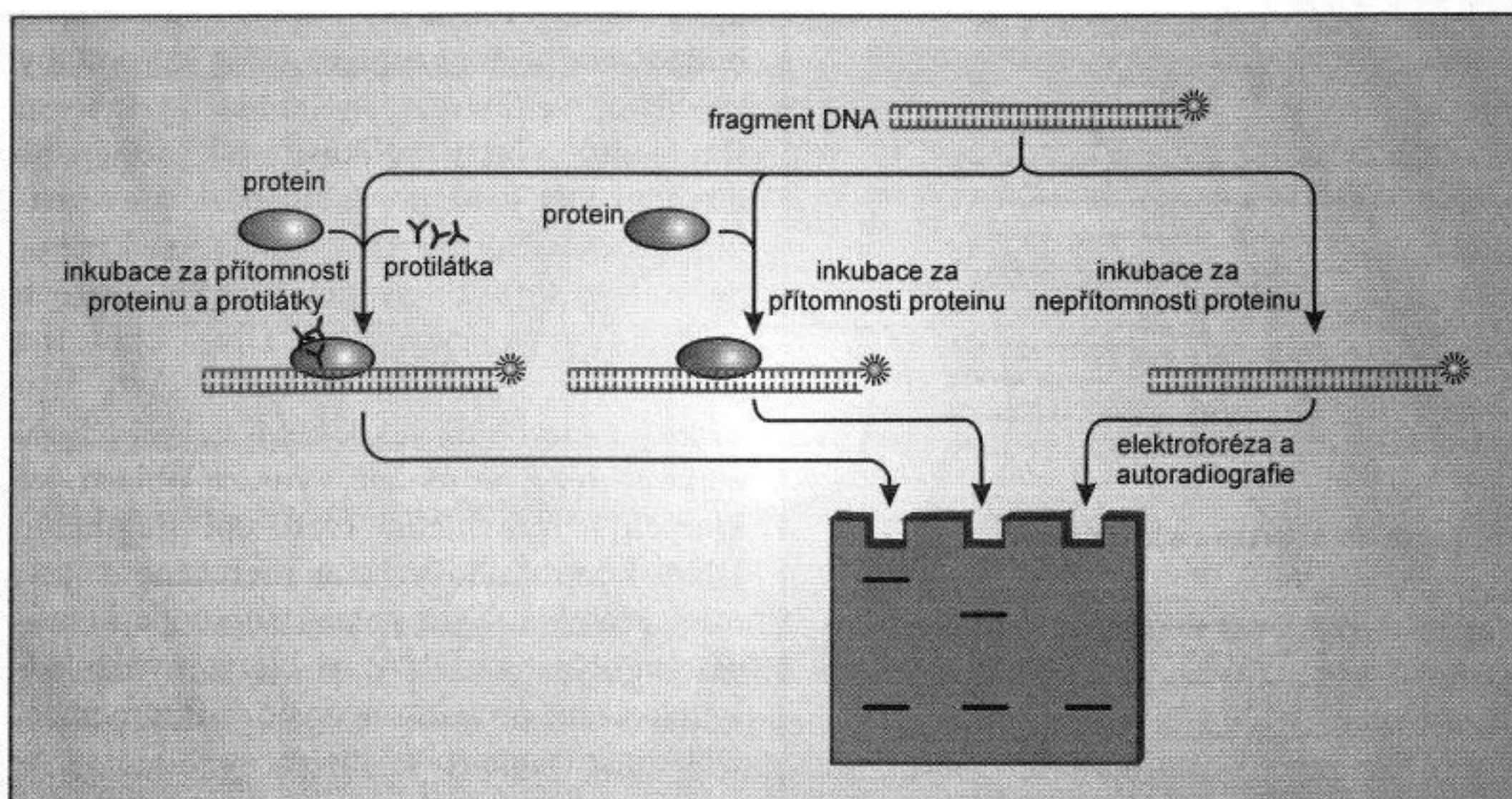
Gelová zpomalovací analýza („gel retardation assay“, „electrophoretic mobility shift assay“). Jiným způsobem, jak určit, zda je určitá sekvence DNA místem vazby daného proteinu, je využití gelové zpomalovací analýzy. Fragment testované značené DNA (sondy) se smísí s purifikovaným proteinem nebo směsí jaderných proteinů a

provede se test pohyblivosti DNA elektroforézou. Jestliže se jeden nebo více z těchto proteinů váže k DNA, způsobí snížení její pohyblivosti v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu. Stupeň snížení pohyblivosti lze snadno demonstrovat při srovnání s kontrolním vzorkem bez přidaného proteinu (obr. 87). Pro ověření specifity interakce protein – DNA se používají dva přístupy: (1) stejná reakce se provádí za přítomnosti zvyšujícího se množství proteinu a zvýšená dávka proteinu by se měla projevit úměrným snížením množství nenavázané sondy DNA a zvýšením množství fragmentu DNA s navázaným proteinem (obr. 87); (2) do reakce se přidá kromě proteinu a DNA sondy také protilátka specifická pro suspektní protein. Navázání této protilátky na cílový protein v komplexu s DNA se projeví dalším snížením pohyblivosti sondy (obr. 88).



Obr. 87 Gelová zpomalovací analýza za přítomnosti purifikovaného proteinu

Jak stopování DNA, tak zpomalovací analýza jsou metody, které je možno použít pro analýzu interakcí jakýchkoliv proteinů s DNA a nejsou omezeny jen na studium interakcí transkripčních faktorů s DNA.



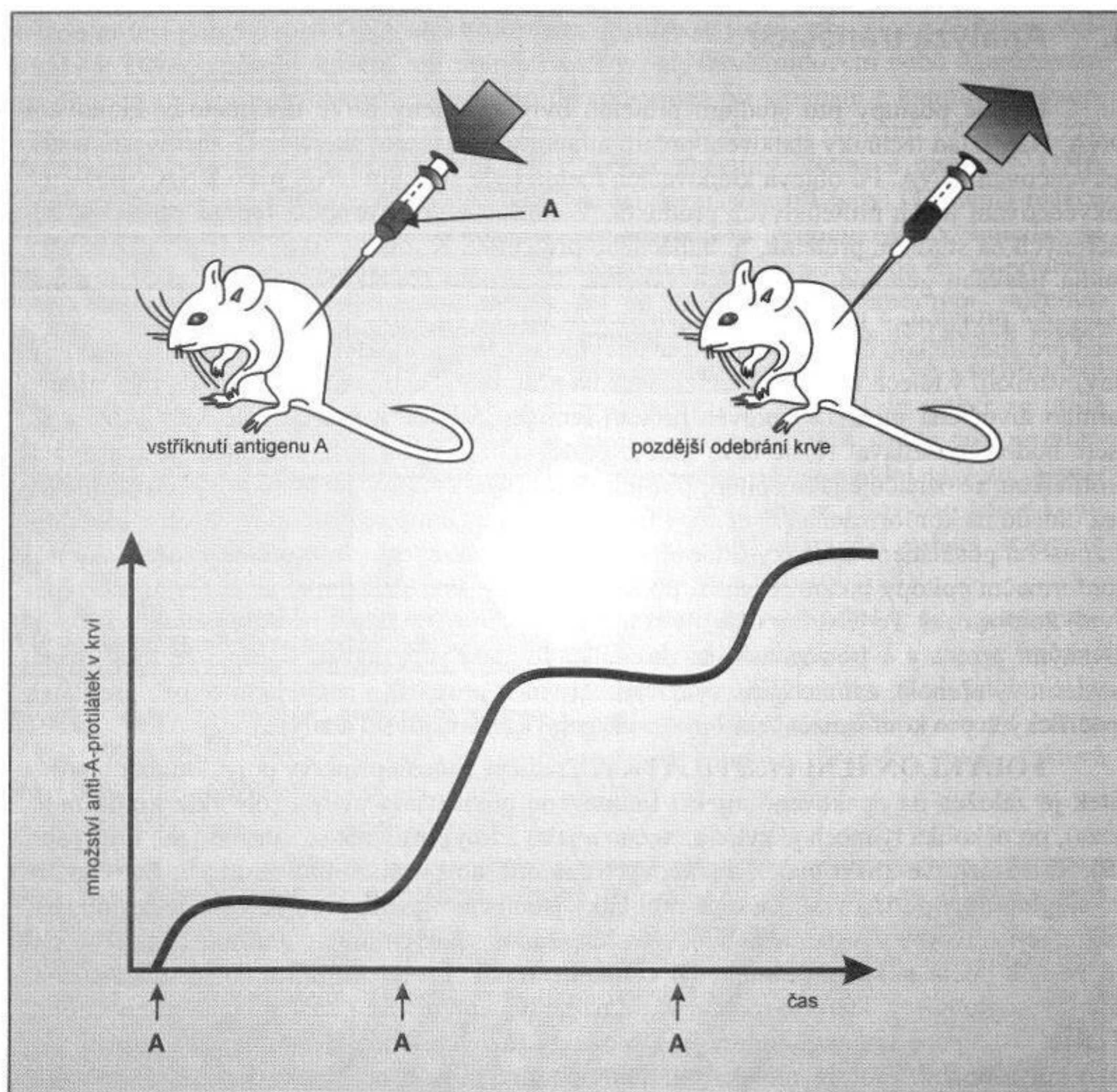
Obr. 88 Gelová zpomalovací analýza za přítomnosti směsi proteinů

4. Analýza translace

Mnohé postupy pro studium proteinů byly zavedeny dříve než metody klonování DNA. Například techniky stanovení pořadí aminokyselin v proteinech byly známy dříve než sekvencování DNA. Po objevu klonovacích metod bylo studium DNA nebo RNA snazší než sekvencování jejich proteinových produktů. V současné době probíhá renesance metod zaměřených na studium proteinů, tj. buněčného proteomu. K tomuto trendu přispívají i závěry studia lidského genomu, ze kterých vyplývá, že genom člověka obsahuje mnohem méně genů než proteinů, a proto je třeba genetickou informaci studovat na obou úrovních. Jako sond pro specifickou detekci proteinů se obvykle využívá protilátek. Protilátky (imunoglobuliny) vznikají v tělech živočichů jako reakce na přítomnost antigenů. Pokud je do těla laboratorního živočicha injekčně vpraven protein (antigen), dojde k tvorbě celé řady protilátek, které budou rozeznávat různé části tohoto proteinu. Ta oblast antigenu, která je rozeznána protilátkou, se označuje jako epitop. Existují (1) lineární epitopy, na které se vážou protilátky bez ohledu na konformaci a (2) epitopy konformační, na které se protilátky vážou v závislosti způsobu poskládání aminokyselinového řetězce. To znamená, že protilátky specifické pro konformační epitopy budou reagovat pouze s proteiny, které zaujmají svou přirozenou (nativní) konformaci. To je velmi důležité si uvědomit, protože některé metody pracují s denaturovanými proteiny a jsou závislé na protilátkách, které rozeznávají lineární epitopy (např. westernový přenos), zatímco jiné využívají nativních proteinů a neobejdou se bez protilátek specifických pro konformační epitopy (např. gelová zpomalovací analýza).

POLYKLONÁLNÍ PROTILÁTKY. Tradiční způsob přípravy polyklonálních protilátek je založen na opakované injekci imunogenu pokusnému zvířeti (obvykle králík nebo koza), po několika týdnech je zvíře utraceno a jako zdroj protilátek se využije jeho krev (obr. 89). Ta se nejprve zbaví buněk a srážlivých faktorů, aby vzniklo antisérum, ze kterého lze imunoglobuliny purifikovat. Získané protilátky jsou heterogenní, protože v důsledku mechanismu jejich tvorby v organismu budou tvořeny řadou různých imunoglobulinů, a to i v případě, že se k imunizaci použije antigen o vysokém stupni čistoty. Antisérum obsahující rozmanité imunoglobuliny, které se mohou vázat na tentýž antigen, se označuje jako polyvalentní. V něm zastoupené imunoglobuliny jsou produkty různých klonů B-lymfocytů a označují se jako polyklonální. Protože molekuly imunoglobulinů si jsou po biochemické stránce velmi podobné, není možné je běžnými technikami frakcionovat a získat tak čisté preparáty jednotlivých typů protilátek.

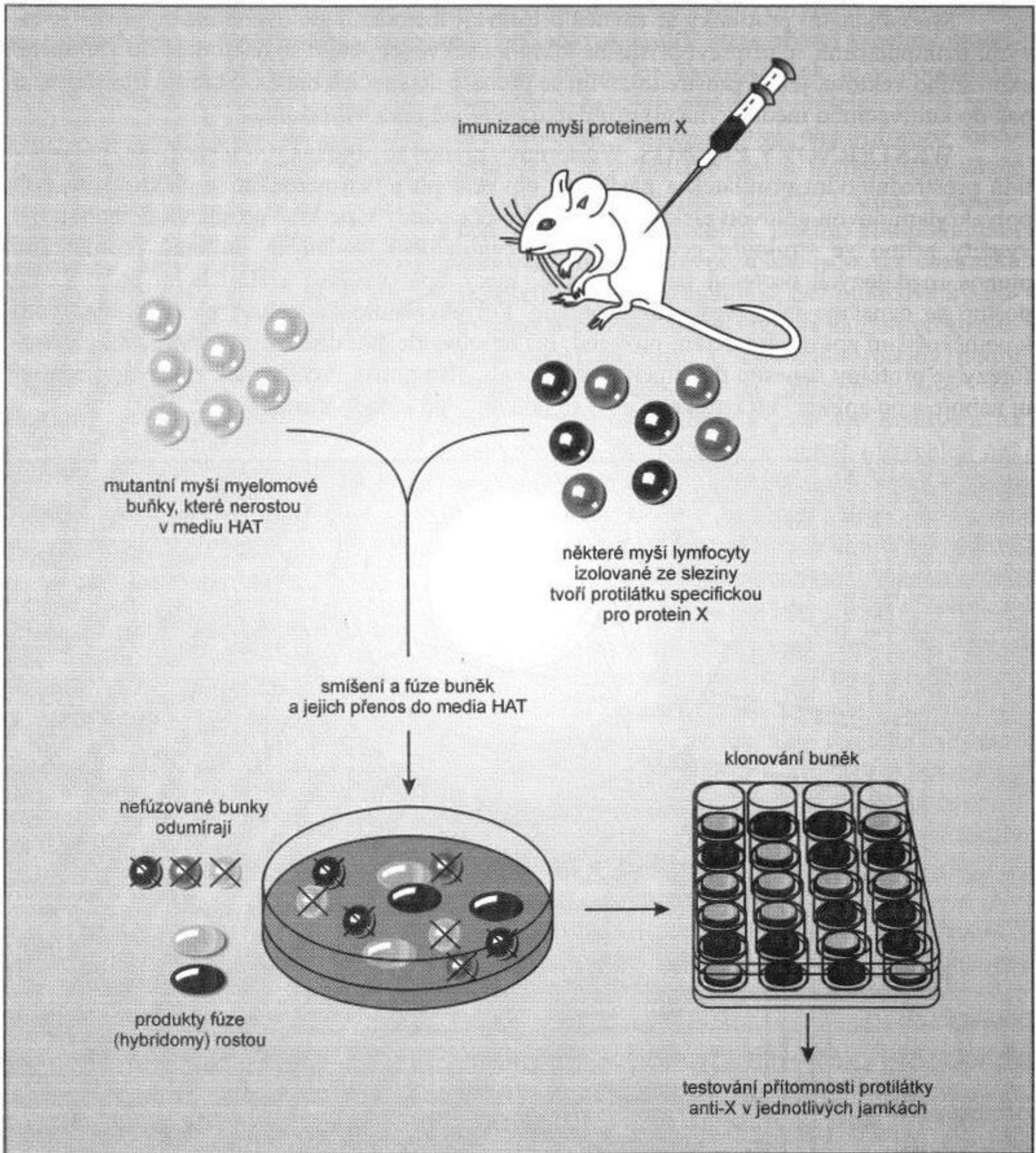
MONOKLONÁLNÍ PROTILÁTKY. Rozmanitost protilátek tvořených v živém organismu po aplikaci čistého antigenu je důsledkem aktivace mnoha různých B lymfocytů, z nichž každý produkuje protilátku, která se různou mírou váže k různým částem antigenu. Tuto rozmanitost by bylo možné snížit oddělením jednotlivých produkčních lymfocytů, tj. jejich klonováním na jednotlivé buňky. V tom případě by jednotlivé klony B lymfocytů produkovaly identické molekuly tzv. monoklonálních protilátek. Bohužel tento přímý způsob je nerealizovatelný, protože buňky produkující protilátky není možno propagovat uměle v kultuře, protože za těchto podmínek nerostou, ani se nedělí. Jedinou výjimkou z tohoto pravidla jsou nádorové plazmatické buňky tzv. myelomy, které rychle rostou v kultuře a přitom účinně produkují protilátky. Protilátky produkované myelomovými buňkami byly velmi cenné při studiu struktury imunoglobulinů, ale jejich další využití je omezeno, protože jejich specifitu nebylo možné ovlivnit. Myelomové buňky vznikají náhodnou transformací normálního lymfocytu do maligního stavu a vytvářená protilátka odpovídá té, kterou lymfocyt produkoval ještě před svou maligní konverzí. Ve snaze získat takové buňky, které tvoří žádanou protilátku jako zdravé B-lymfocyty po imunizaci a zároveň jsou schopny růstu v kultuře jako buňky myelomové, provedli Cesar Milstein a Georges Köhler v roce 1975 fúzi obou typů



Obr. 89 Příprava polyklonálních protilátek

buněk a podařilo se jim získat hybridní buňky zvané hybridomy. Tyto buňky aktivně rostly v kultuře a účinně produkovaly velké množství jediné (monoklonální) protilátky a to takové, kterou syntetizoval normální lymfocyt imunizovaného pokusného zvířete před fúzí.

Postup přípravy monoklonálních protilátek popisuje obr. 90. Nejprve se provede imunizace myši antigenem, který může být v rozpustné formě nebo součástí intaktní buňky. V imunizované myši následně dojde k proliferaci buněk produkujících příslušné protilátky. Z utraceného zvířete se vyjme slezina a získané lymfocyty se použijí k fúzi s maligními myelomovými buňkami prostřednictvím fúzogenu polyetylenglykolu. Hybridní buňky se oddělují od nefúzovaných buněk na základě schopnosti růstu na selekčním médiu HAT. Označení média odráží začáteční písmena třech jeho hlavních složek: hypoxantin, ametopterin a tymin. Médium HAT umožňuje růst pouze těm buňkám, které disponují funkční hypoxantin-guanin fosforibosyltransferázou (HGPRT). Buňky, které jsou HGPRT⁻, jako linie myelomových buněk použitých k fúzi, na tomto médiu nerostou. Přestože jsou lymfocyty HGPRT⁺ na médiu HAT rovněž neporostou, vzhledem k absenci schopnosti proliferace



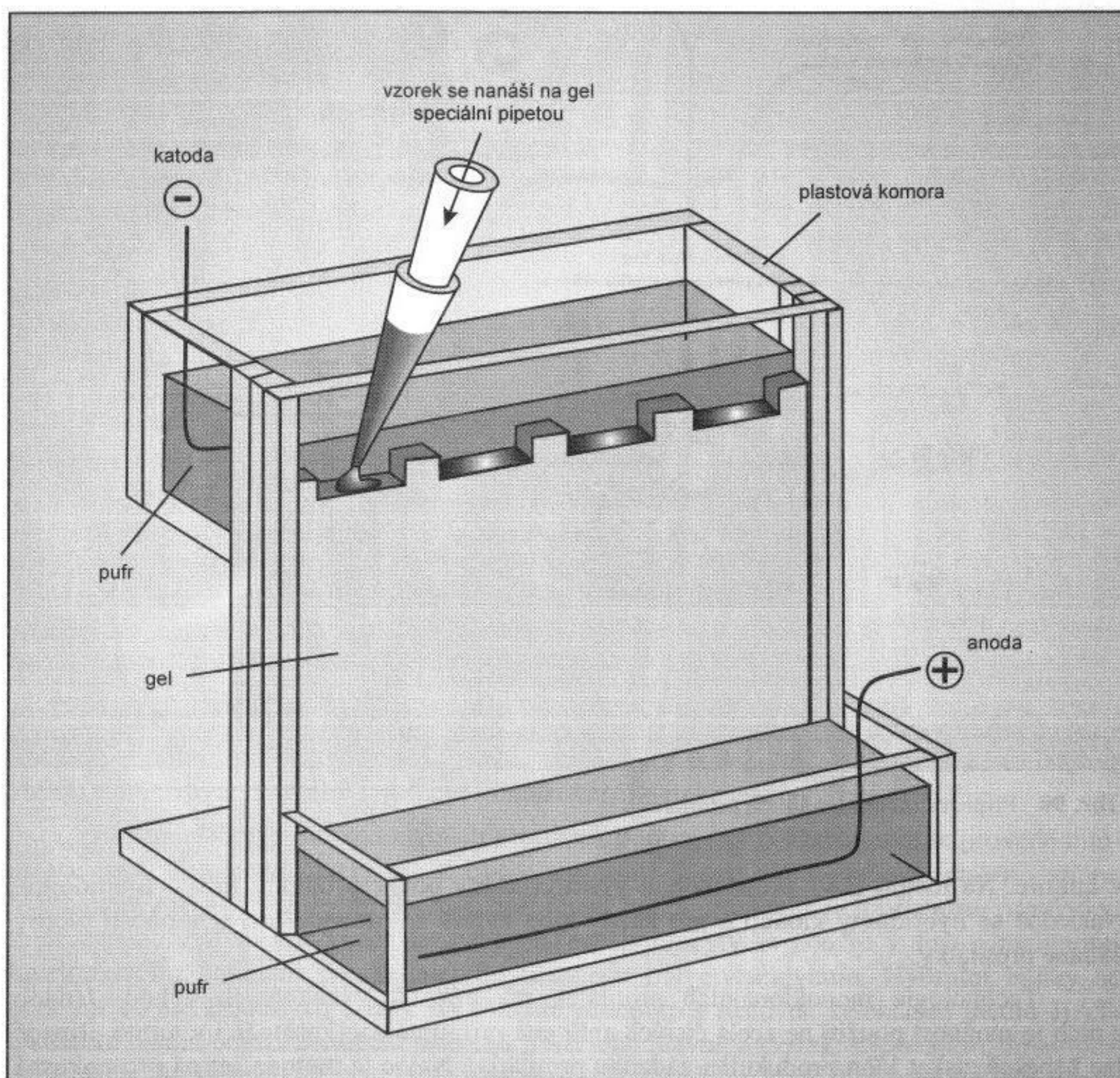
Obr. 90 Příprava monoklonálních protilátek

v kultuře. Na mediu HAT proto mohou vytvářet klony pouze produkty fúze – hybridomy. Následně se hybridomy klonují a pro každý klon zvlášť se provede test schopnosti tvorby žádané protilátky.

Technologie monoklonálních protilátek má několik významných výhod. Jednou z nich je možnost použití ne zcela čistých antigenů pro imunizaci, protože i v tomto případě lze úspěšně získat klon produkující žádanou protilátku. Navíc je metoda šetrná pro pokusná zvířata. Po vyčerpání zásob dané protilátky není nezbytné celý postup, včetně utracení zvířete, opakovat. Hybridomy zamražené při velmi nízké teplotě si uchovávají neomezenou životaschopnost a po rozmražení a nové kultivaci lze v kultivačním mediu získat monoklonální protilátku v neomezeném množství.

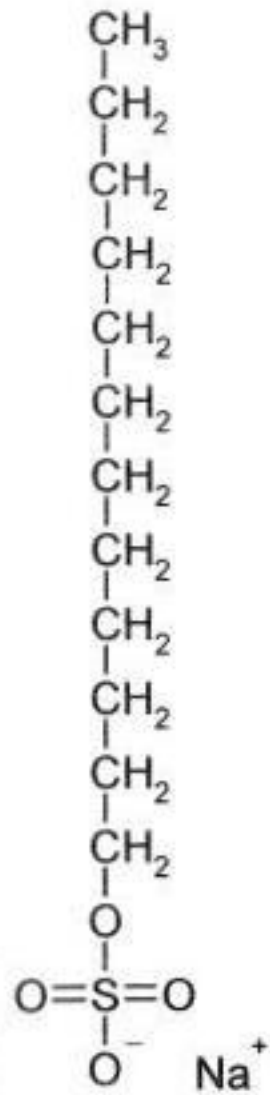
Monoklonální protilátky se rovněž připravují metodami genového inženýrství. Genovými manipulacemi se připraví příslušná kódující sekvence, která se naklonuje do vhodného expresního vektoru, jehož prostřednictvím se přenese do savčích buněk. Stabilní transfektanti pak do kultivačního média vylučují protilátku podobně jako hybridomy.

WESTERNOVÝ PŘENOS. Westernový přenos se používá pro identifikaci polypeptidů prostřednictvím protilátek a následuje obvykle po jejich rozdělení v elektrickém poli polyakrylamidovou gelovou elektroforézou. Protože sondy v podobě protilátek nemohou být využity přímo ve struktuře gelu, předchází zviditelnění hledaných proteinů protilátkami přenos rozdělených proteinů na membránu, který opět využívá elektrického pole. Tento postup se označuje jako westernový přenos. Polyakrylamidová gelová elektroforéza patří k nejběžnějším způsobům dělení proteinů. Při nejobvyklejším deskovém uspořádání elektroforézy se proteiny nanosou do jamek gelu v alkalickém pufru. Proteiny tak získávají negativní náboje a po aplikaci elektrického pole se pohybují od katody k anodě (obr. 91).

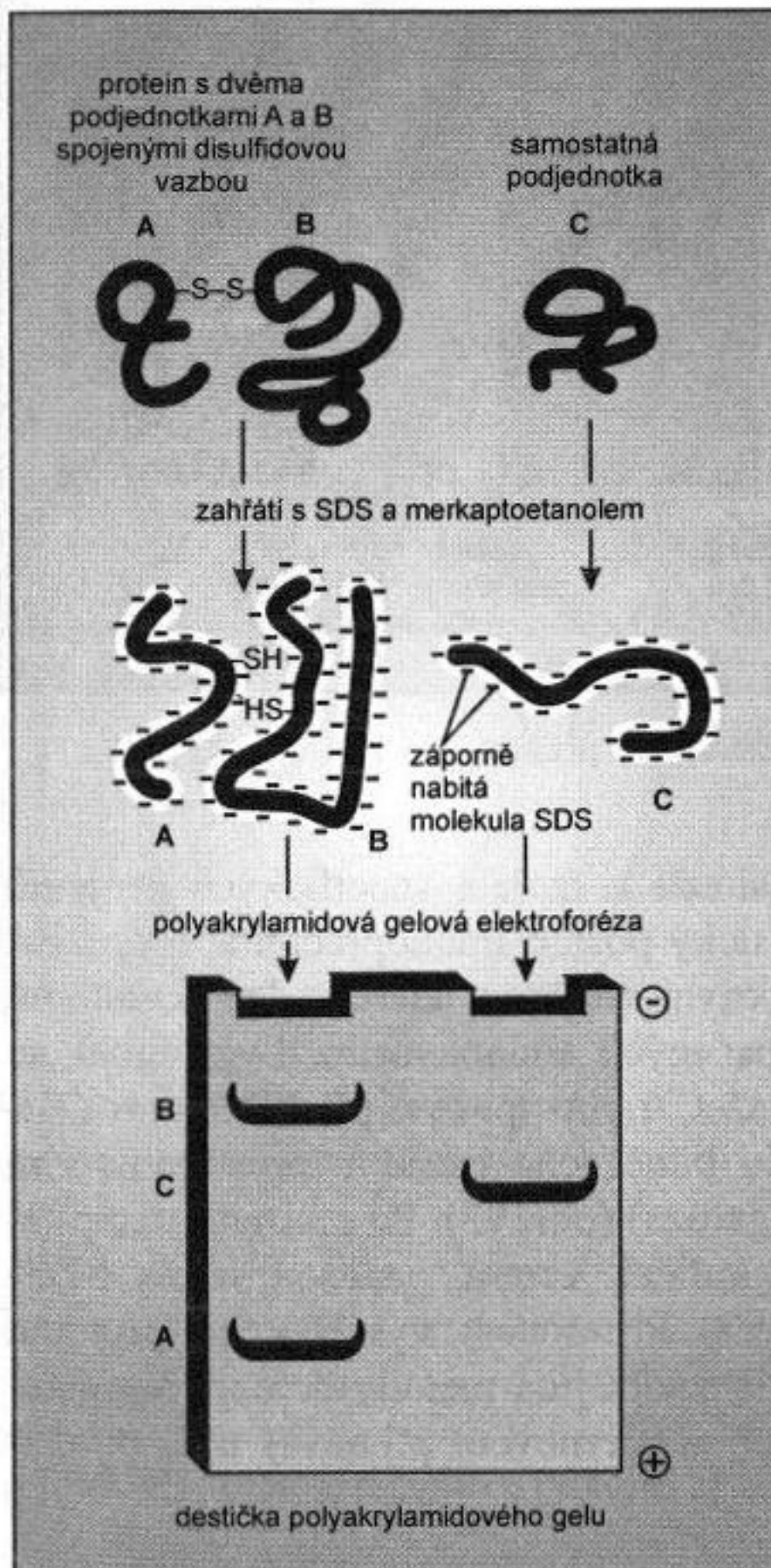


Obr. 91 Elektroforéza proteinů

Jedním ze způsobů jak proteiny po dokončení elektroforézy zviditelnit je použití nespecifických barviv (např. stříbro, coomassie briliantová modř), které obarví všechny proteiny daného vzorku. Protože však je v normálním buněčném extraktu přítomno proteinů příliš mnoho, proteiny se při nativní elektroforéze často překrývají a je obtížné získat jednoznačný závěr o proteinových profilech daného vzorku a zastoupení specifických proteinů. Dalším komplikujícím faktorem je fakt, že proteiny jsou po chemické stránce mnohem rozmanitější než nukleové kyseliny. Jejich pohyblivost gelem při nativní elektroforéze závisí na tvaru (globulární proteiny putují rychleji než vláknité), na „hustotě náboje“ (tj. poměru velikosti náboje k jednotce hmoty) a na velikosti (menší molekuly se pohybují rychleji než větší). Naproti tomu molekuly nukleových kyselin jsou z hlediska tvaru a rozdělení náboje uniformní. Interpretaci výsledků polyakrylamidové gelové elektroforézy proteinů významně usnadňuje její denaturační varianta zvaná SDS-PAGE. Při této variantě se proteiny před nanesením na polyakrylamidový gel denaturují detergentem laurylsíranem sodným (SDS) (obr. 92), případné disulfidové vazby se eliminují redukčním činidlem (β -merkaptoetanolem), takže se rozpadnou komplexy složené z více proteinů a denaturace se dokončí krátkým varem. Malé a negativně nabitě molekuly SDS obklopí makromolekulu proteinu a v důsledku jejich elektrostátického odpuzování dojde k natažení (denaturaci) proteinu (obr. 93). Proto za přítomnosti SDS proteiny zaujmají obdobný tyčinkovitý tvar. Navíc, vzhledem k tomu, že počet molekul SDS navázaných na protein je zhruba úměrný jeho molekulové hmotnosti, získává každý protein za přítomnosti SDS, bez ohledu na svou velikost, ekvivalentní hustotu náboje. Jediným faktorem, který bude rozhodovat o pohyblivosti proteinů při SDS-PAGE bude jejich molekulová hmotnost (tzv. efekt molekulárního síta).

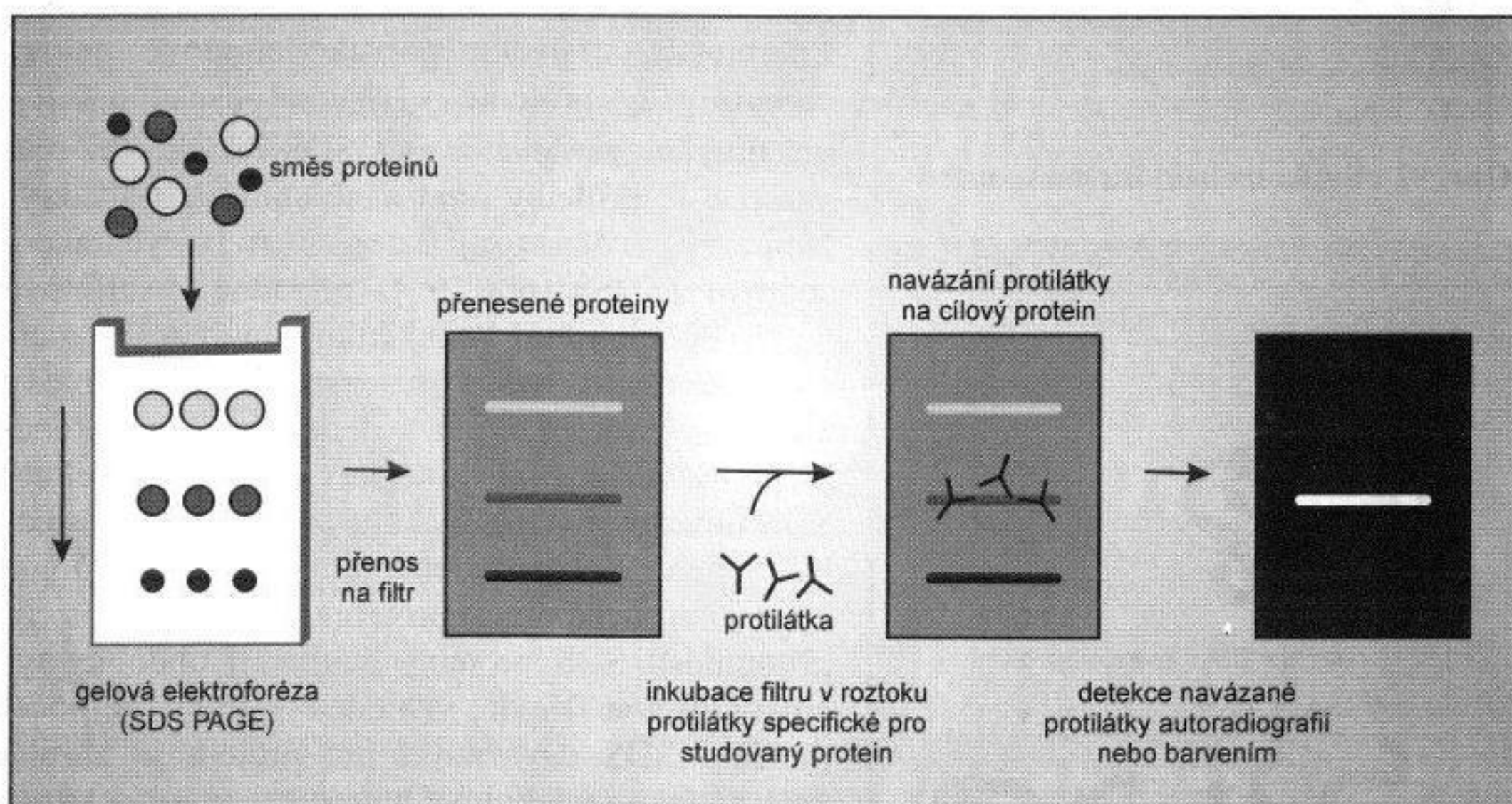


Obr. 92 Struktura laurylsíranu sodného



Obr. 93 Využití laurylsíranu sodného při denaturaci proteinů při SDS-polyakrylamidové gelové elektroforéze

Proteiny rozdělené SDS-PAGE lze zviditelnit nescificky – přímým obarvením v gelu obarvením nebo specificky – protilátkami. Pro detekci specifických proteinů protilátkami je třeba rozdělené proteiny nejprve přenést westernovým přenosem na nitrocelulózovou membránu. Za tímto účelem se gel přikrytý membránou znovu vystaví elektrickému poli, které je orientováno kolmo k rovině pole použitého k původnímu rozdělení proteinů v gelu tak, aby se rozdělené proteiny v nezměněné vzájemné poloze přenesly na membránu. Tento postup se označuje elektrický přenos („electroblotting“). Jakmile jsou proteiny imobilizovány na membráně, lze je podrobit reakci s protilátkou specifickou pro studovaný protein jednoduše tak, že se celá membrána promývá v roztoku protilátky, která je schopna rozeznat lineární epitop (protein je denaturován). Po odmytí nenavázané protilátky se protilátka asociovaná s antigenem obvykle zviditelňuje prostřednictvím sekundární protilátky konjugované s určitým enzymem (např. alkalickou fosfatázou), která rozeznává a váže imunoglobulin protilátky primární. Celý komplex pak lze zviditelnit barevnou reakcí katalyzovanou enzymem sekundární protilátky nebo autoradiograficky, pokud je použita protilátka radioaktivně značená (obr. 94).

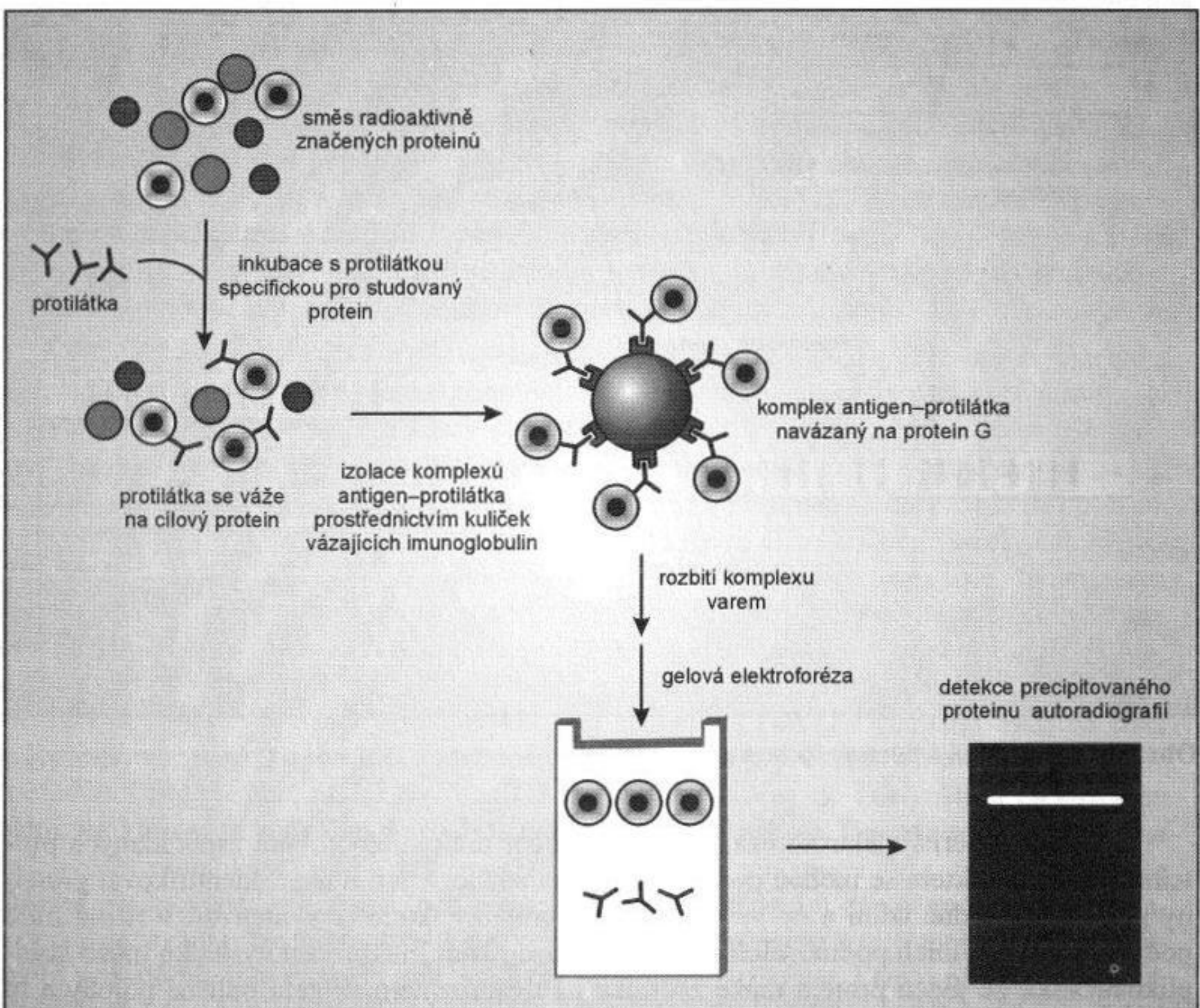


Obr. 94 SDS-polyakrylamidová gelová elektroforéza a westernový přenos

IMUNOPRECIPITACE. Imunoprecipitace slouží k izolaci specifických proteinů z proteinových směsí prostřednictvím protilátek. Klasický postup imunoprecipitace využívá nescifického označení buněčných proteinů radioaktivní značkou, kterého lze dosáhnout např. kultivací buněk za přítomnosti radioaktivně značených aminokyselin. Lyzí buněk se vytvoří extrakt, ze kterého lze specifický protein vysrážet, tj. precipitovat příslušnou protilátkou a komplexy protilátka/antigen oddělit od zbytku buněčného extraktu prostřednictvím kuliček vážoucích imunoglobuliny (např. protein G-agaróza) (obr. 95). Po promytí precipitátu se cílové proteiny oddělí od imunoglobulinů a kuliček varem, nanesou se na SDS-polyakrylamidový gel, kde se podrobí elektroforéze. Přítomnost vysráženého proteinu v gelu se prokáže autoradiograficky. Pokud jsou k dispozici jiné metody detekce vysrážených proteinů (podobně jako pro detekci proteinů po westernovém přenosu) není použití radioaktivních značek nutné.

Technika imunoprecipitace v kombinaci westernovým přenosem se s výhodou používá pro studium interakcí mezi proteiny. Postupuje se tak, že se cílový protein sráží z buněčných extraktů za takových podmínek, které neničí vazby mezi proteiny. Cílový protein se proto bude srážet v komplexu se svými přirozenými partnery. Teprve po oddělení vysrážených proteinů od ostatních složek buněčného extraktu se provede denaturace purifikovaných komplexů, SDS-PAGE a analýza společně srážených proteinů westernovým přenosem.

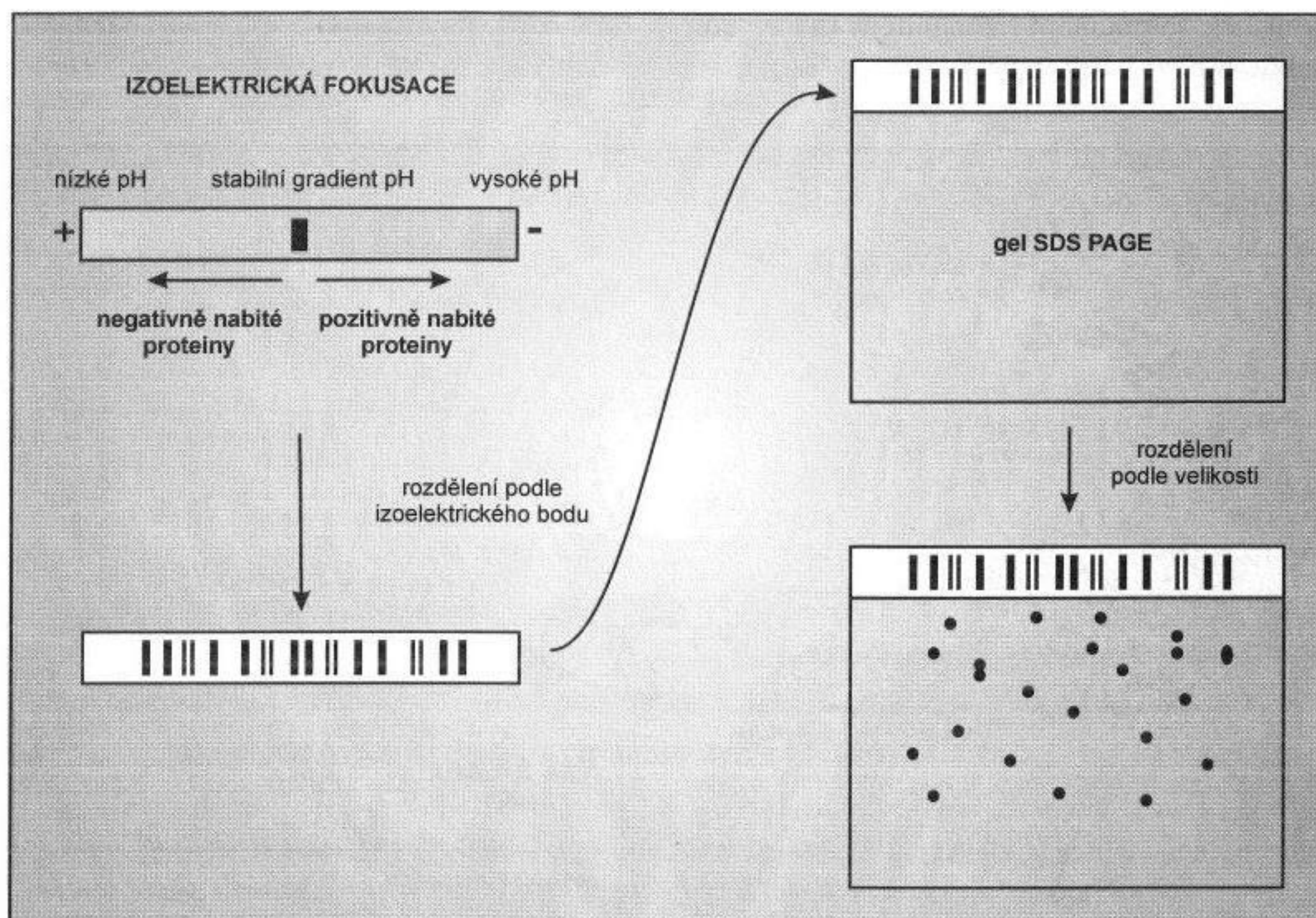
IMUNOCYTOCHEMIE A IMUNOHISTOCHEMIE. Tyto dvě metody se odlišují podle toho, zda slouží k analýze jednotlivých buněk nebo tkání. Na rozdíl od westernového přenosu, který umožňuje určit, zda je protilátková sonda specifická, kolik peptidů je schopna rozeznat a jakou mají velikost, cytologická/histologická metoda je zaměřena na určení buněk, ve kterých je daný genový produkt lokalizován. Ve srovnání s hybridizací *in situ* zaměřenou na lokalizaci specifických transkriptů je imunocytochemický nebo imunohistologický přístup výhodnější. Jednak je vlastní provedení experimentu jednodušší a riziko falešných artefaktů nižší a jednak je získaná informace o nitrobuněčné lokalizaci proteinu mnohem cennější než informace o nitrobuněčné lokalizaci mRNA. Zatímco transkript se obvykle objevuje v sousedství jádra, kde se podrobuje translaci, poloha proteinového produktu translace je mnohem rozmanitější (např. jádro, cytoplazma, membrána) a může tak naznačit, jakou funkci v buňce hraje.



Obr. 95 Imunoprecipitace proteinu ze směsi a jeho detekce gelovou elektroforézou

IZOELEKTRICKÁ FOKUSACE A DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA.

Westernový přenos je výhodná metoda pro analýzu určitého proteinu za předpokladu, že máme k dispozici příslušnou protilátku, není však vhodná pro testování celkového zastoupení proteinů v dané buněčné populaci. Pro tento účel je vhodnější dvourozměrná gelová elektroforéza, která zahrnuje v jednom směru izoelektrickou fokusaci a v druhém směru SDS-PAGE (obr. 96). Principem izoelektrické fokusace je aplikace elektrického pole napříč stabilním gradientem pH. Všechny proteiny jsou typické svým izoelektrickým bodem (pI), který představuje takové pH, při kterém nemají ani pozitivní ani negativní náboj. Při vyšších hodnotách pH než je pI ponese protein negativní náboj, naopak při nižším pH než pI ponese protein pozitivní náboj. Negativně nabitě proteiny se v gradientu pH budou pohybovat směrem ke kladně nabitě elektrodě (anodě), a to tak dlouho, dokud nedosáhnou takového pH, které odpovídá pI. V tomto bodě všechny náboje ztratí a jejich pohyb se zastaví. Naopak kladně nabitě proteiny, dokud nedosáhnou pI, se budou pohybovat ke katodě. Výsledkem těchto procesů je „zaostření“ každého proteinu do specifického bodu gradientu pH. Ve druhém rozměru se proteiny rozdělují podle velikosti.



Obr. 96 Izoelektrická fokusace proteinů

Dvourozměrná elektroforéza poskytuje soubor určitým způsobem uspořádaných proteinových skvrn, které se mohou porovnat s jinými soubory, a tím např. identifikovat proteiny přítomné v jedné tkáni a ne ve druhé, nebo proteiny, které se syntetizují v různé míře podle změn v okolních podmínkách nebo podle fáze růstu. Interpretaci výsledků může komplikovat fakt, že jeden protein může zaujímat na dvourozměrném gelu odlišné polohy a to např. v důsledku rozdílných post-translačních modifikací. Dvourozměrnou elektroforézou s vysokým rozlišením může být rozděleno až 10 000 proteinových skvrn.

SLOUPCOVÁ CHROMATOGRRAFIE. Principem sloupcové chromatografie je rozdělení proteinových směsí do frakcí na základě jejich odlišné prostupnosti náplní chromatografické kolony. Směsi proteinů z buněčných extraktů se nanášejí na horní část kolony, procházejí její náplní a ve spodní části z ní vytékají do připravených zkumavek. Rychlost, s jakou jednotlivé proteiny kolonou procházejí, závisí na jejich interakcích s náplní kolony. Podle typu těchto interakcí se rozlišuje iontoměničová chromatografie, gelová chromatografie a afinitní chromatografie. Při iontoměničové chromatografii je pro prostupnost kolonou určující elektrická interakce mezi náplní kolony s navázanými kladnými nebo zápornými náboji (tzv. iontoměničem) a nabitými skupinami proteinů a lze ji ovlivňovat pH nebo iontovou silou roztoku. Ty lze regulovat tak, aby se dosáhlo účinné separace. Při gelové chromatografii se náplň skládá z porézních zrněk, do které proteiny o menší molekulové hmotnosti vstupují, a tak jsou ve svém postupu kolonou zpomalovány, zatímco proteiny o větší molekulové hmotnosti do zrněk vstupovat nemohou a kolonou proto postupují rychleji. Separace proteinů je v tomto případě založena na jejich velikosti (tzv. gelová filtrace). Při afinitní chromatografii je náplň kolony opatřena takovými molekulami, které specificky interagují s cílovým proteinem v buněčném extraktu. K tomuto účelu se často využívá vysoce specifických interakcí typu enzym/substrát nebo antigen/protilátka. Proteiny specificky navázané v koloně lze následně uvolnit změnou pH nebo koncentrace solného roztoku, kterým se kolona promývá. V tomto případě je možno získat proteiny zcela čisté.

DVOUROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA A HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE. Jednorozměrná elektroforéza se obvykle zaměřuje na studium omezeného počtu proteinů. Pro určení úplného profilu proteinů, které studovaný organismus syntetizuje za definovaných podmínek jsou výhodnější proteomické přístupy. Odlišnost obou přístupů je analogická jako při srovnání studia jednotlivých genů a sekvencováním celého genomu. Profil všech syntetizovaných proteinů se označuje jako proteom (analogicky jako genom označuje soubor všech genů daného organismu) a jeho studium se označuje jako proteomika. Zatímco genom daného organismu představuje relativně stabilní jednotku, profil syntetizovaných proteinů je proměnlivý a reaguje např. na podmínky růstu nebo diferenciací impulsy.

Obvyklým proteomickým přístupem je snaha definovat všechny proteinové skvrny na gelu po dvourozměrné elektroforéze. Spolehlivým způsobem, jak definovat daný protein, je stanovit jeho sekvenci aminokyselin. V současné době jsou k dispozici velmi pokročilé mikrosekvenační techniky, které umožňují stanovit sekvenci aminokyselin z proteinových skvrn eluovaných z gelu. Tato strategie je však pro analýzu všech proteinů na gelu velmi pracná. Za předpokladu, že je známa sekvence genomu, je vhodnou alternativou použití proteolytického enzymu pro štěpení proteinu eluovaného z gelu ve specifických místech vymezených přítomností určitých aminokyselin. Tímto způsobem se daný protein rozdělí do souboru peptidů, jejichž molekulovou hmotnost lze přesně stanovit hmotnostní spektrometrií. Hmotnostní spektrometrie rozděluje proteiny podle poměru jejich hmoty a náboje. Studovaná molekula se nejprve ionizuje a to obvykle buď technikou MALDI („matrix-assisted laser desorption/ionization“) nebo ESI („electrospray ionization“), protože tyto techniky nevedou k nežádoucí fragmentaci molekuly. Vzniklé ionty jsou vtaženy do analyzátoru elektrickým polem, ve kterém se rozdělují podle poměru hmotnosti a náboje. Ze sekvence genomu lze předpovědět aminokyselinovou sekvenci všech potenciálních proteinů, a z této informace můžeme předpovědět velikosti všech peptidů vzniklých štěpením danou proteázou. Počítačovým zpracováním lze srovnat velikosti peptidů daného proteinu izolovaného z gelu s velikostmi peptidů předpovězených proteinů a tak protein identifikovat. I tento přístup je pracný, pokud je třeba ručně eluovat každý protein. Pro provádění těchto experimentů ve větším rozsahu je výhodné použít automatické zařízení, které každou proteinovou skvrnu jednotlivě

izoluje z gelu a provede hmotnostní spektrometrii. Tímto způsobem lze provést rozsáhlou globální analýzu jakéhokoliv proteomu.

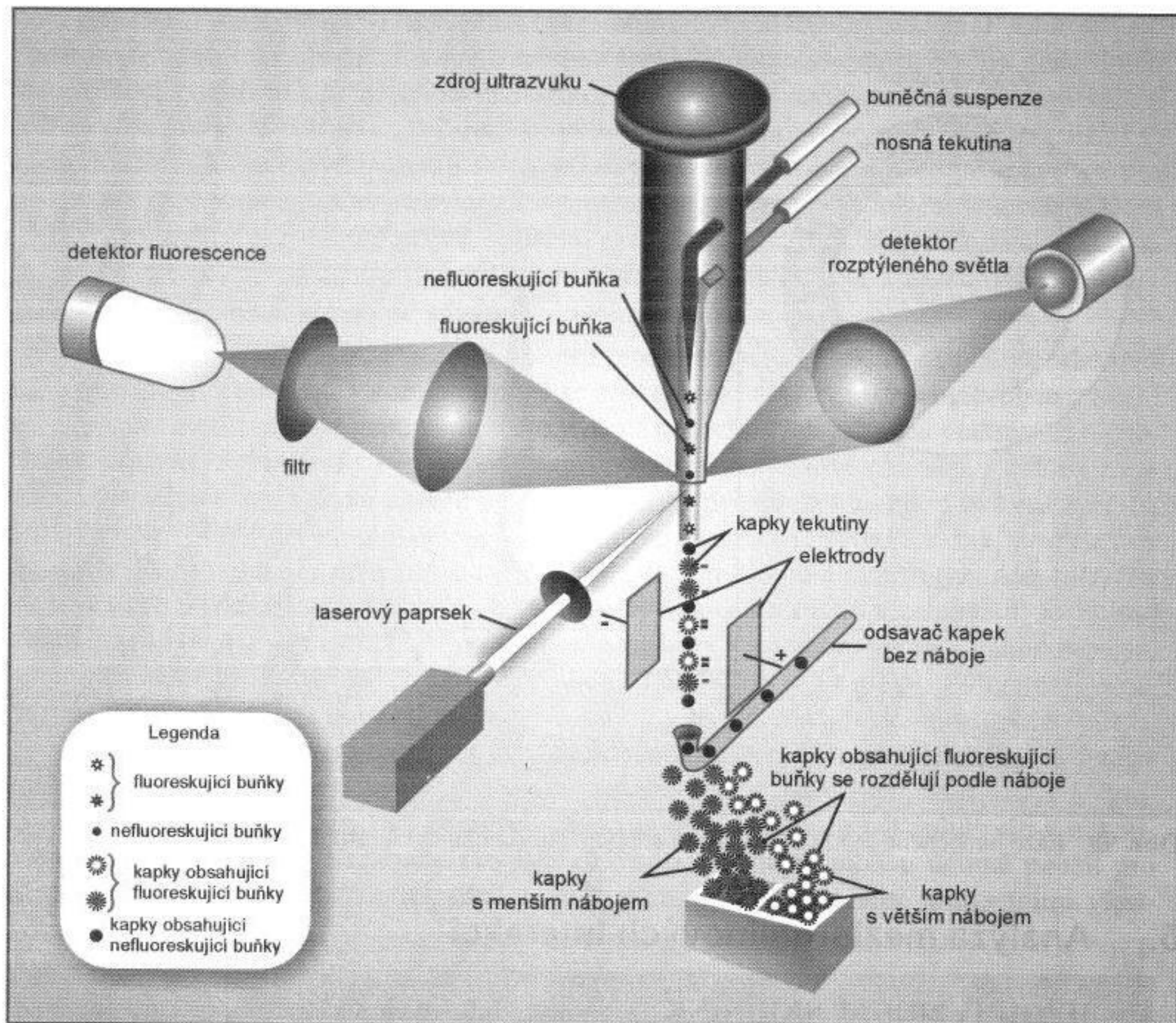
Pokud není úplná sekvence genomu k dispozici, lze pomocí určité varianty hmotnostní spektrometrie identifikovat alespoň část aminokyselinové sekvence proteinu. Na základě této informace lze předpovědět sekvenci části DNA odpovídajícího genu a sestavit sondu pro jeho identifikaci z genové knihovny.

PROTEINOVÉ MIKROČIPY. Proteinové mikročipy představují velmi slibný experimentální přístup pro analýzu proteinů v budoucnosti. Mohou se použít pro purifikaci proteinů, stanovení expresních profilů nebo meziproteinových interakcí. Existuje mnoho typů látek vhodných pro imobilizaci na mikročipech, jako např. protilátky, receptory, ligandy, nukleové kyseliny, uhlovodíky nebo látky s určitými biochemickými vlastnostmi (např. kationty, anionty, látky s hydrofilním nebo hydrofobním povrchem). Některé z těchto látek mají nízkou specifitu a vážou celé skupiny proteinů, ale jiné jsou vysoce specifické a vážou jen určitý typ proteinu z komplexní proteinové směsi. Po inkubaci testovaného vzorku se sondami na mikročipu a odmytí molekul reagujících nespecificky jsou zachycené proteiny krátce vystaveny laseru a dále analyzovány hmotnostní spektrometrií MALDI.

PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE. Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje komplexní studium určitých parametrů v buněčných populacích. Jedinečnost této metody spočívá v tom, že poskytuje informace o jednotlivých buňkách, resp. jejich jednotlivých molekulách a nikoliv o buněčné populaci jako celku, jak tomu je u většiny jiných metod. Počet analyzovaných jednotlivých buněk se běžně pohybuje v řádu 10 000, což umožňuje statistické zhodnocení získaných dat. Průtoková cytometrie může být zaměřena na studium míry přítomnosti určitých antigenů v jednotlivých buňkách a její závislosti na čase (např. v průběhu diferenciaci) nebo na studium obsahu DNA v jednotlivých buňkách, která odpovídá např. fázi buněčného cyklu nebo programované buněčné smrti. Metodu lze také použít pro stanovení velikosti jednotlivých buněk, studium karyotypu nebo stupně granulace cytoplazmy, což může být významné z hlediska určení buněčných typů ve směsích buněk. Kromě těchto základních funkcí může průtoková cytometrie sloužit také k frakcionaci buněk podle určitých vlastností (např. podle stupně exprese sledovaného markeru) za předpokladu, že je cytometr opatřen frakcionačním zařízením (FACS – „fluorescence-activated cell sorter“).

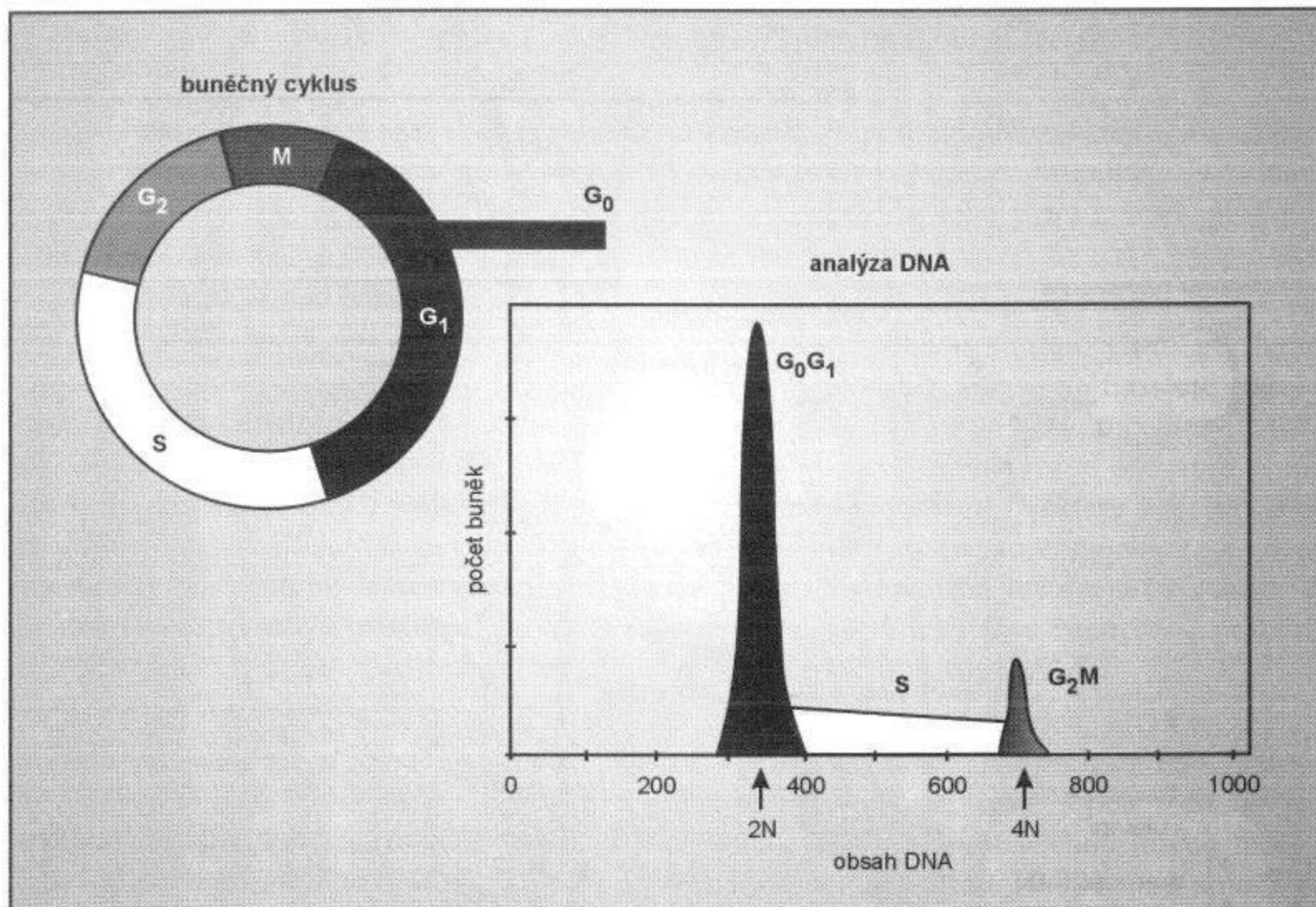
Princip metody spočívá ve sledování míry fluorescence jednotlivých buněk v buněčné populaci, ve které míra fluorescence odpovídá sledovanému parametru (např. množství určitého antigenu nebo DNA). Získaná data jsou počítačově zpracována. Postupuje se tak, že se koncentrovaná suspenze buněk opatří fluorescenční značkou, která se specificky váže na cílovou molekulu. Pro označení DNA se obvykle používá fluorescenční barvivo propidium jodid (v permeabilizovaných buňkách) nebo Hoechst 33342 (v nepermeabilizovaných, tj. živých buňkách) a pro rozmanité proteinové antigeny protilátka konjugovaná s fluorescenční značkou. Buněčná suspenze se v trysce průtokového cytometru nejprve ultrazvukem o určité frekvenci rozdělí na malé kapičky, z nichž každá obsahuje pouze jednu buňku (obr. 97). Jednotlivé kapičky postupně procházejí vlastním měřicím zařízením, ve kterém se ozáří laserovým paprskem. Excitovaná fluorescenční značka emituje záření, které se pro každou buňku zvlášť zachycuje detekčním zařízením a ukládá v paměti počítače. U cytometrů s frakcionačním zařízením se každé kapičce udělí elektrický náboj, jehož velikost odpovídá míře emitované fluorescence. Při průchodu elektrickým polem mezi dvěma deskovými elektrodami se modifikuje dráha procházejících kapek podle velikosti náboje tak, že je možné jejich zachycení do oddělených zkumavek. Jednou z podstatných výhod průtokové cytometrie je fakt, že buňky nejsou vlastním měřením nijak poškozeny ani kontaminovány a lze je použít pro další kultivaci.

ANALÝZA GENOVÉ EXPRESE



Obr. 97 Průtokový cytometr s frakcionačním zařízením

Jednou z podstatných aplikací průtokové cytometrie je analýza buněčného cyklu. Buňky podléhající mitóze lze v buněčné populaci rozlišit relativně snadno, protože kondenzované chromozomy jsou po obarvení a analýze světelnou mikroskopií zřetelné. Avšak rozlišení buněk, které procházejí fázemi G1, S nebo G2 je tradičními metodami obtížné. Průtoková cytometrie využívající barvení DNA fluorescenčními barvivy, např. propidium jodidem, je pro tento typ analýzy ideální, protože dokáže rozlišit, zda obsah DNA v jednotlivých buňkách odpovídá fázi před replikací (tj. G1) nebo je dvojnásobný (tj. G2/M) (obr. 98). Buňky, jejichž obsah DNA je intermediární (větší než G1 a menší než G2/M), představují buňky, která aktivně replikují svou DNA, tj. nachází se ve fázi S. Fáze G2 a M nejsou průtokovou cytometrií rozlišitelné.

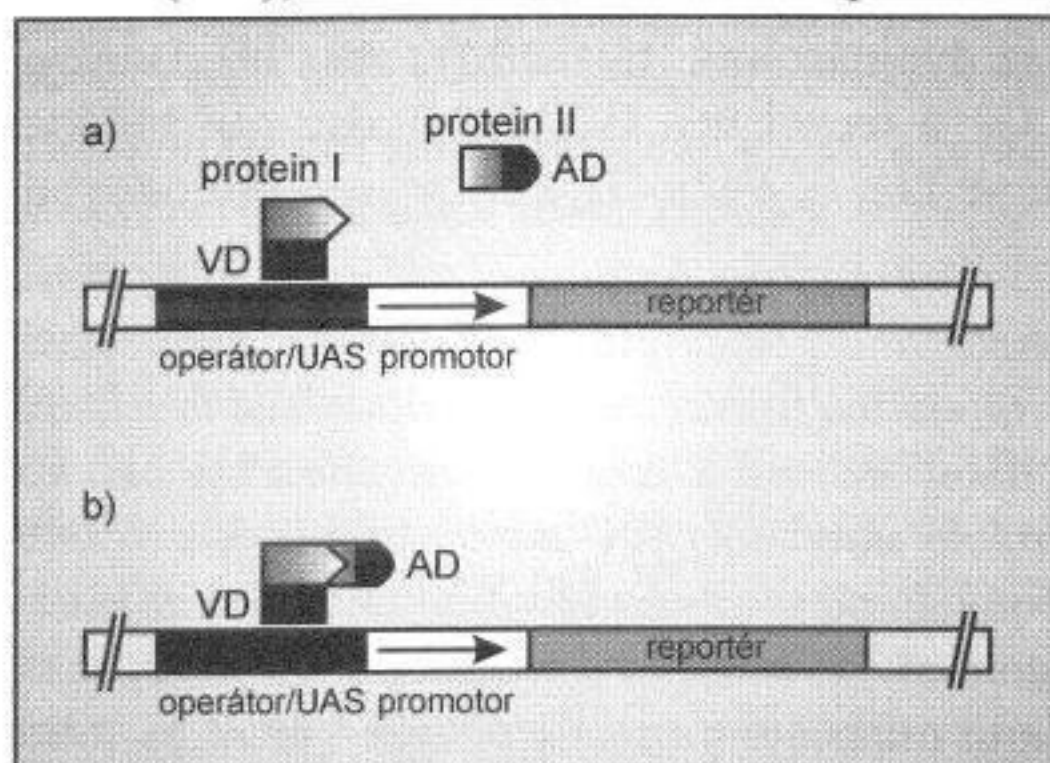


Obr. 98 Fáze buněčného cyklu a histogram analýzy buněčného cyklu průtokovou cytometrií

5. Analýza meziproteinových interakcí

DVOUHYBRIDNÍ SKRÍNINK. Jednou z důležitých vlastností proteinů je jejich schopnost interagovat s jinými proteiny. Dvouhybridní skrínink slouží pro studium těchto meziproteinových interakcí. Vzhledem k tomu, že tato metoda se obvykle provádí s použitím kvasinkových buněk, nazývá se kvasinkový dvouhybridní skrínink. V současné době jsou však již vypracovány varianty této metody pro bakteriální a savčí buňky.

Metoda využívá obdobného principu jako kvasinkový jednohybridový systém, který byl popsán na str. 134, v tom smyslu, že využívá modulární povahy aktivátorů transkripce. Tyto komplexní molekuly nesou aktivační doménu (AD) a doménu zajišťující vazbu na DNA (VD), které dokážou transkripčně aktivační funkci zajistit, aniž by byly kovalentně spojeny.

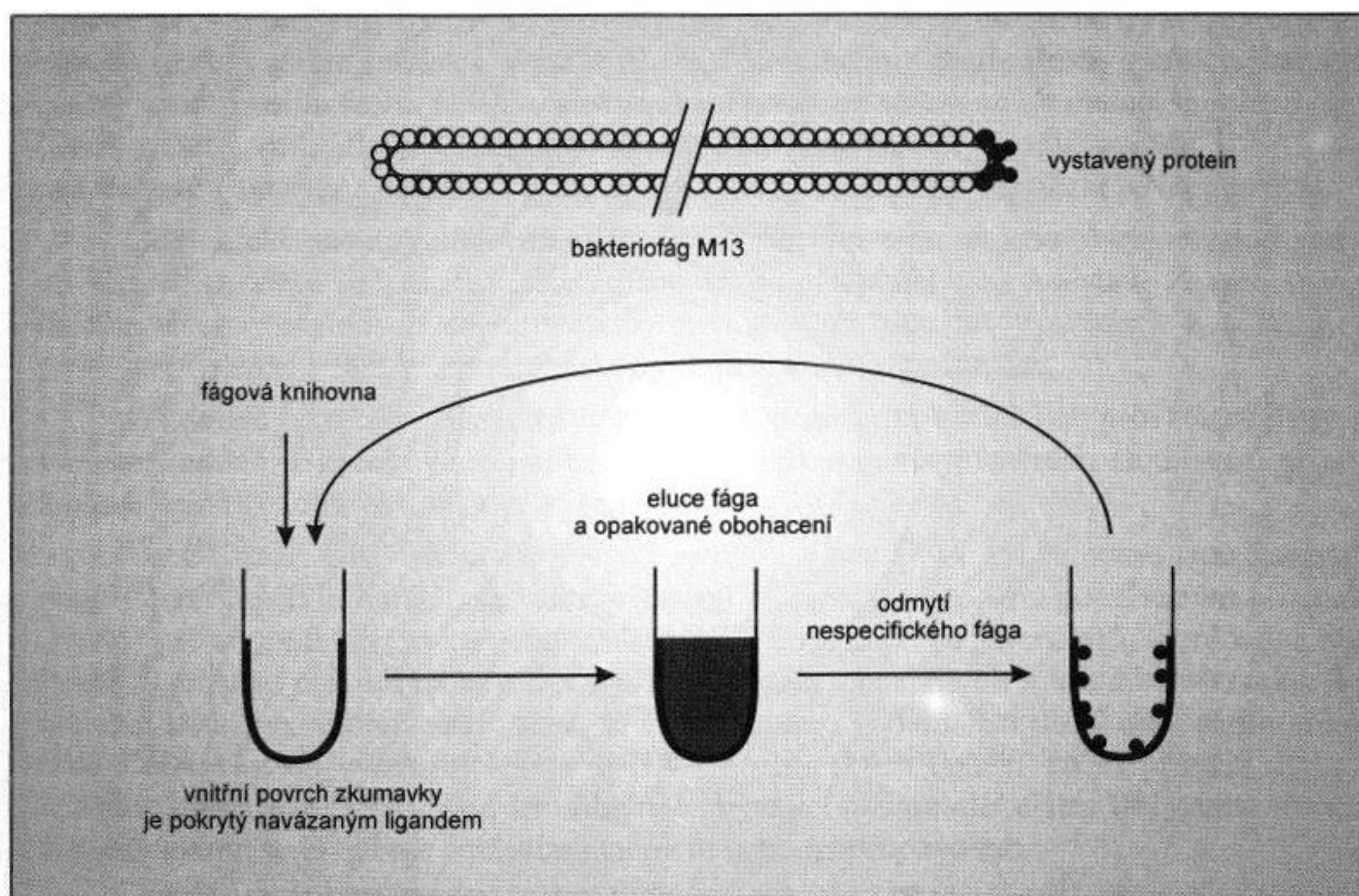


Obr. 99 Kvasinkový dvouhybridní systém

spojeny. K aktivaci transkripce reportérského genu postačuje nekovalentní interakce aktivační domény s vazebnou doménou připojenou k DNA. Provedení metody vyžaduje přípravu dvou rekombinantních plazmidů. První plazmid musí zajistit expresi testovaného proteinu I s uměle připojenou doménou pro vazbu DNA (VD). Druhý plazmid musí kódovat testovaný protein II s uměle připojenou aktivační doménou (AD) (obr. 99). V obou případech expresí vznikají proteino-ové chiméry. Oba plazmidy se přenesou do speciálního kvasinkového kmene, který ve

svém genomu obsahuje reportérský gen s operátorem nebo aktivační sekvencí, ke které má afinitu použitá proteinová doména pro vazbu na DNA. K expresi reportérského genu dojde pouze tehdy, pokud budou proteinového chiméry vzájemně interagovat. Tento systém se může použít pro testování interakcí mezi produkty dvou klonovaných genů, nebo může být prostřednictvím knihovny fragmentů DNA připravené ve jednom vektoru přizpůsoben pro identifikaci těch proteinů, které interagují s proteinem kódovaným druhým vektorem. Kvasinkový dvouhybridní systém původně využíval aktivační a DNA vazebnou doménu proteinu GAL4, ale protože mezi těmito doménami není přímý fyzický kontakt může být kterákoliv z nich nebo obě dvě nahrazeny doménami z jiných proteinů.

FÁGOVÝ DISPLAY. Pro studium meziproteinových interakcí se používá také metoda zvaná fágový display. V tomto případě se sekvence kódující zkoumaný protein začlení do klonovacího místa uvnitř genu kódujícího jeden z povrchových proteinů vláknitého bakteriofága, např. M13. Fúzovaný gen se bude exprimovat do proteinové chiméry, která by měla být použita k sestavení fágové částice tak, aby cizorodý protein nebo peptid byl vystaven na jejím povrchu (obr. 100). Knihovna pro fágový display může být vytvořena tak, že obsahuje fragmenty DNA kódující celé proteiny, jejich části, nebo syntetické oligonukleotidy. Ty fágové částice, které vystavují proteiny nebo peptidy s požadovanými vlastnostmi, se mohou snadno purifikovat prostřednictvím specifické protilátky, receptoru nebo jiného proteinu, kterým se pokryje vnitřní povrch zkumavky nebo mikrotitrační destičky. Bakteriofágy neschopné specifické interakce se odmyjí a navázaný fág se pak eluuje. Účinnost tohoto postupu se může zvýšit opakovanou aplikací fága na selekční povrch. Hlavní výhodou této techniky spočívá v tom, že umožňuje testování velmi vysokého počtu fágových částic. Fágový lyzát M13 může dosahovat až titru 10^{12} fágových částic na mililitr a může být aplikován v několika opakovaných cyklech. Knihovny pro fágový display se proto mohou účinně použít pro skrínink specifických proteinů, případně peptidů s enzymatickými nebo antigenními vlastnostmi.



Obr. 100 Fágový display

IX. Metody molekulární virologie

Viry představují zvláštní kategorii živých soustav. Vyznačují se nebuněčnou strukturou a závislostí na hostitelské buňce. Způsobují několik forem infekce, které závisí na typu viru a na citlivosti buňky. Rozlišujeme proto (1) cytotocidní infekci, při které se viry pomnožují a buňku obvykle usmrtí; (2) perzistentní infekci, kterou buňka přežije, je nepoškozená a působí jako rezervoár viru nebo jeho genomu; (3) transformující infekci, kterou buňka rovněž přežije, avšak mění se morfologicky, fyziologicky a geneticky.

Metody molekulární diagnostiky virů byly vyvinuty v průběhu posledních dvaceti let. Tyto metody umožňují rozlišit a charakterizovat obrovské množství virů, izolovaných z tkáňových a buněčných kultur, nebo přímo z infekčních materiálů u nichž se předpokládá výskyt nekultivovatelných virů, např. papilomavirů a hepadnavirů. Většina metod pro detekci virů v klinických laboratořích je založena na těchto principech: (1) identifikaci cytopatického efektu virů (CPE) v buněčných kulturách; (2) přímé detekci virů použitím fluorescenčních protilátek; (3) imunologických metodách detekujících virové antigeny; (4) amplifikačních metodách genomových nukleových kyselin virů.

Pro typizaci a subtypizaci virů jsou výše uvedené metody rozšiřovány o serologické a molekulární přístupy. Serologické metody umožňují identifikaci jedinečných antigenních epitopů. Molekulární metody slouží k identifikaci virů a k analýze nukleotidových sekvencí genomů virů. Těmito metodami je možné identifikovat mutační změny jednotlivých bází a využívají se pro charakterizaci a subtypizaci virů, které mají význam pro epidemiologické účely a pro zkoumání patogeneze a vývoj virózy.

Genomy virů jsou tvořeny buď DNA nebo RNA. Podle typu genomu se rozlišuje pět základních skupin virů (dsDNA; ssDNA; dsRNA; +ssRNA; -ssRNA-viry). Genomy virů obsahují velmi stabilní oblasti, v nichž dochází k mutacím velmi zřídka, zatímco jiné jejich oblasti mutují velmi často. U RNA virů dochází k vzniku spontánních mutací mnohem častěji než u DNA virů. Hlavní příčinou je skutečnost, že RNA-polymerázy nemají 3' → 5' exonukleázovou aktivitu a nemohou proto opravit chyby vzniklé při replikaci RNA genomu.

Metodické postupy molekulární analýzy virového genomu jsou obvykle velmi podobné metodám, které se používají pro genetické studie buněčných soustav. Z toho důvodu nejsou všechny metody uvedené v následující kapitole detailně vysvětleny a odkazujeme proto na příslušné kapitoly s podrobným výkladem k těmto postupům.

Podobně jako u buněčných systémů jsou to metody, v nichž se provádí analýzy genomové nukleové kyseliny. Základem všech analýz a genotypizačních studií virů je proto izolace jejich genomové nukleové kyseliny.

IZOLACE GENOMOVÉ DNA. Postupy izolace DNA z virů, které jsou kultivovatelné v buněčných kulturách, se velmi podobají izolačním metodám, používaným při izolaci DNA z prokaryontních i eukaryontních buněk. U virů, např. papilomavirů, které nelze kultivovat *in vitro* se provádí izolace DNA přímo z buněk obsažených v klinickém vzorku. Tyto izolační postupy zahrnují navíc krok, kterým je nutno oddělit fázi obsahující nízkomolekulární DNA viru od vysokomolekulární DNA hostitelských buněk. To se provádí srážením vysokomolekulární DNA chloridem litným a zbývající nízkomolekulární DNA viru obsažená v supernatantu se extrahuje srážením etanolem nebo izopropanolem.

IZOLACE GENOMOVÉ RNA. Postupy izolace RNA z virů jsou složitější než postupy izolace DNA. Zahrnují navíc kroky zajišťující ochranu RNA před rozkladem RNázou,

což je velmi stabilní protein, který odolává mnohým chemickým činidlům a je rovněž relativně termorezistentní. Nejčastěji se jako inhibitor RNázy používá guanidin thiokyanát (GTC). Dlouhodobě se RNA o velikosti větší než 1 kb uchovává v etanolu při nízkých teplotách. Manipulace s RNA je nutno provádět v ledové lázni, používat ochranné rukavice a pracovat za aseptických podmínek.

APLIKACE METOD ANALÝZY GENOMU U VIRŮ. V tabulce 5 jsou uvedeny molekulární metody nejčastěji používané ke studiu primární struktury virového genomu a subtypizaci virů způsobujících onemocnění člověka. Jednotlivé metody jsou podrobněji popsány v následujícím textu.

Tabulka 5 Genotypizační metody používané k analýze genomů některých virů

Viry (druh/rod)	Metody
Adenoviry (Lidský adenovirus 2)	RFLP-analýza
Flaviviry (Virus horečky Dengue)	sekvencování genomu
Flaviviry (Virus hepatitidy C)	SSCP-analýza; PCR-SSCP-analýza; zpětná hybridizace; metoda DEIA; sekvencování genomu
Hepadnaviry (Virus hepatitidy B)	Southernův přenos a hybridizace; SSCP-analýza; PCR-SSCP-analýza; sekvencování genomu
Herpesviry (Cytomegalovirus)	RFLP-analýza; PCR-RFLP-analýza; Southernův přenos a hybridizace
Herpesviry (Virus Epstein a Barové)	RFLP-analýza
Herpesviry (Herpes simplex virus 1)	RFLP-analýza; PCR-RFLP-analýza; Southernův přenos a hybridizace
Herpesviry (Varicella-zoster virus)	RFLP-analýza; PCR-RFLP-analýza
Pikornaviry (<i>Enterovirus</i> , Poliovirus)	RFLP-analýza; RT-PCR-RFLP-analýza; analýza otisku RNázaT1-oligonukleotidů; SSCP-analýza; sekvencování genomu
Pikornaviry (<i>Rhinovirus</i>)	sekvencování genomu
Ortomyxoviry (Virus chřipky A)	test ochrany před účinkem RNázy A; sekvencování nukleotidů; metoda HMA
Papovaviry (JC virus)	sekvencování genomu
Paramyxoviry (Virus spalniček)	RT-PCR-RFLP-analýza
Paramyxoviry (Parainfluenzavirus)	sekvencování genomu
Paramyxoviry (<i>Pneumovirus</i>)	test ochrany před účinkem RNázy A; PCR-RFLP-analýza; sekvencování genomu
Parvoviry (Parvovirus B19)	SSCP-analýza; PCR-SSCP-analýza
Reoviry (<i>Rotavirus</i>)	analýza polymorfizmu délky segmentů genomu
Retroviry (HIV, HTLV-1, HTLV-2)	metody HMA a HTA; sekvencování genomu

Pozn.: Zkratky a jejich význam jsou uvedeny v jednotlivých částech textu popisujících principy metod.

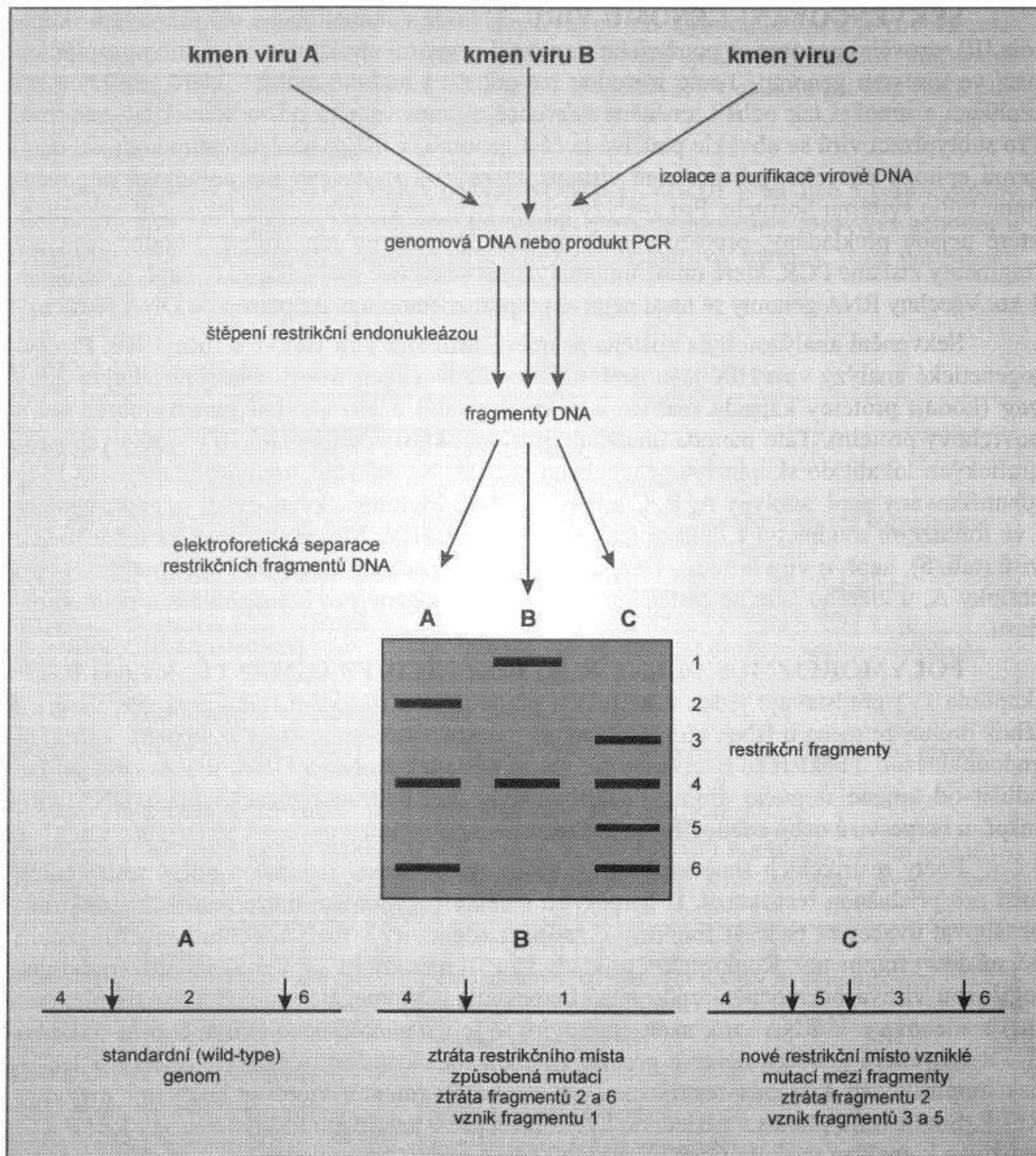
SEKVENCOVÁNÍ GENOMU VIRŮ. Metoda automatického sekvenování (kapitola III) virového genomu se používá ke stanovení primární struktury a lineárního uspořádání bází ve virovém genomu. Touto metodou lze odhalit i bodové mutace, které vzniknou při replikaci a umožní tak odlišit změněné sekvence potomstva virů od rodičovského genomu. Pro subtypizaci virů se obvykle používá ta část genomu, v níž se nachází geny kódující antigenní epitopy povrchových proteinů virionů, které jsou vystaveny imunologické odpovědi imunitního systému hostitele. Pro analýzy tohoto typu jsou nejvhodnější jedinečné sekvence, které nejsou překládány, protože v nich dochází k mutacím jen zřídka. Vhodné jsou též fragmenty získané PCR, které umožňují analyzovat sekvence malých úseků, např. o velikosti 1 kb. Všechny RNA genomy se musí nejprve přepsat zpětnou transkriptázou do DNA řetězce.

Sekvenční analýzou byla zjištěna primární struktura viru HIV-1 v roce 1985. Pro fylogenetické analýzy viru HIV jsou nejčastějším cílem sekvenování oblasti obsahující geny *gag* (kódují proteiny kapsidu matrice a nukleokapsidu) a *env* (kódují transmembránový a povrchový protein). Tato metoda umožňuje provádět klasifikaci izolátů HIV z různých geografických lokalit do skupin fylogenetického stromu. Na základě srovnávacích analýz byly identifikovány např. subtypy A, B, C a E u viru HIV. Metody sekvenování se např. využilo i ve forenzním soudnictví k důkazu iatrogenní infekce HIV. Metoda se používá též u jiných virů (tab. 5), např. u viru horečky Dengue (rod *Flavivirus*), JC viru (rod *Papovavirus*) a viru chřipky A, u kterého jsou nejčastějšími cílovými místy geny pro hemagglutinin a neuraminidázu.

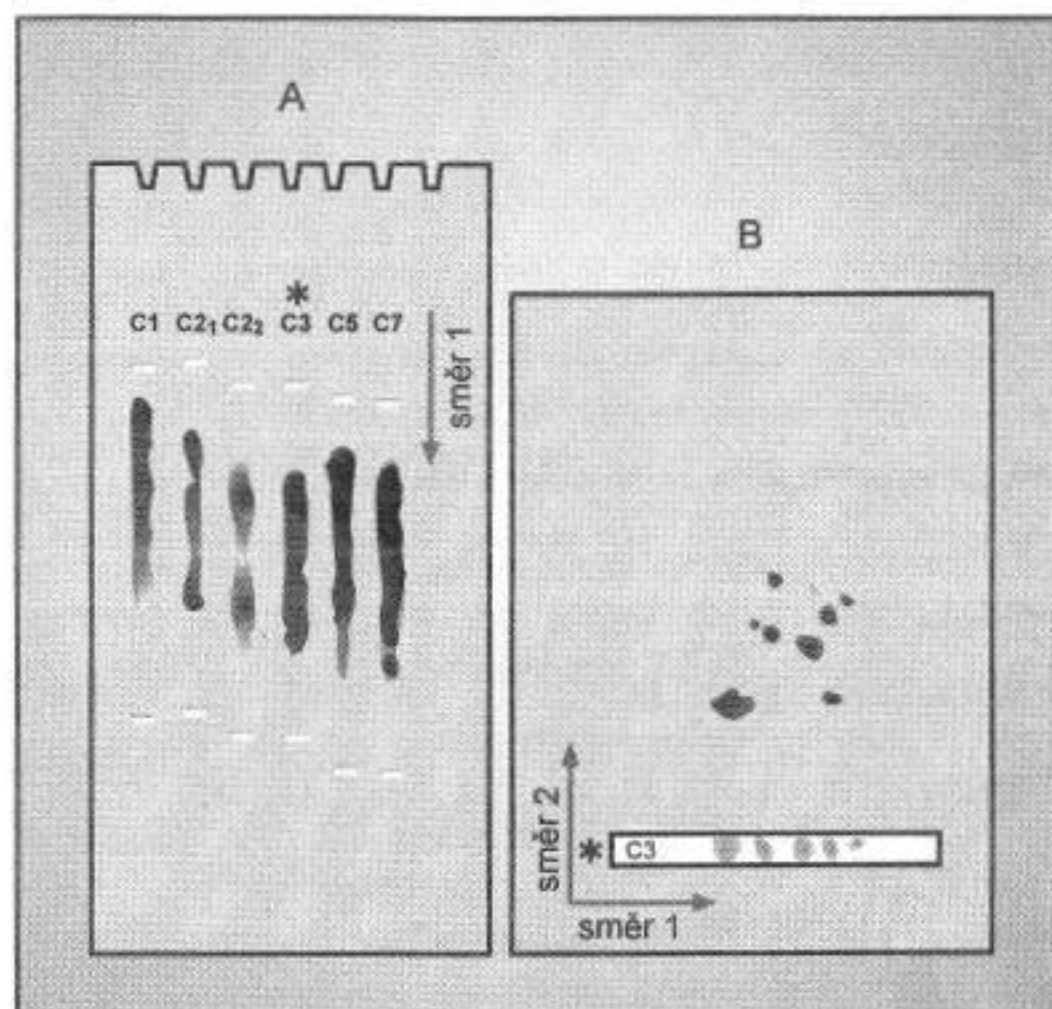
POLYMORFIZMUS DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ. Metoda RFLP (kapitola IV) představuje jednu z nejčastěji používaných metod analýzy genomů zástupců téhož druhu, zejména u DNA virů. Přítomnost mutace v sekvenci, která je štěpena restriční endonukleázou u některého z kmenů virů, má za následek změnu v DNA otisku, čímž jej lze odlišit od kmene stejného druhu. Použití metody RFLP k subtypizaci izolátů DNA virů (např. u herpesvirů nebo adenovirů) je znázorněna na obr. 101.

Počty restričních fragmentů DNA závisí na velikosti genomu a počtu restričních míst pro příslušnou restriktázu. U herpesvirů s velkým genomem může restriční spektrum obsahovat dvacet až padesát fragmentů, zatímco adenoviry s malým genomem mají jenom pět až deset fragmentů. Konkretními příklady využití metody RFLP v molekulární epidemiologii jsou virová onemocnění způsobená herpesviry (Cytomegalovirus, Herpes simplex virus) a adenoviry. U RNA virů, např. enterovirů se jejich genom nebo cílová část na 5'-konci (UTR-sekvence) genomu nejprve přepíše zpětnou transkriptázou do DNA řetězce a ten je pak amplifikován a štěpen restriktázou za vzniku fragmentů, které se analyzují metodou RFLP. Southernův přenos s následnou hybridizací představuje modifikaci metody RFLP a je používán k analýze výskytu různých subtypů herpesvirů (Cytomegalovirus), zejména u pacientů trpících AIDS a u pacientů s transplantovanými ledvinami.

ANALÝZA FRAGMENTŮ RNA ŠTĚPENÝCH RNÁZOU T1 („OLIGONUCLEOTIDE FINGERPRINT ANALYSIS“). Metoda je založená na štěpení radioaktivně značené ^{32}P genomové ssRNA RNázou T1. Tato endonukleáza, která je izolovaná z *Aspergillus oryzae*, štěpí řetězec RNA na 3'-konci v místě, v němž se vyskytují zbytky kyseliny guanylové. Separace jednotlivých fragmentů se provádí dvourozměrnou elektroforézou (obr. 102) v polyakrylamidovém gelu. V prvním směru probíhá chlazená elektroforéza v polyakrylamidu obsahujícím močovinu. Pruh polyakrylamidu obsahující otisk separovaných fragmentů RNA se vyřízne a podrobí se nechlazené polyakrylamidové gelové elektroforéze v kolmém směru. Detekce fragmentů se provádí autoradiograficky. Tato metoda byla použita zejména u enterovirů a dále rovněž u viru chřipky A a viru vezikulární stomatitidy.



Obr. 101 Genotypizace tří izolátů DNA virů analýzou RFLP

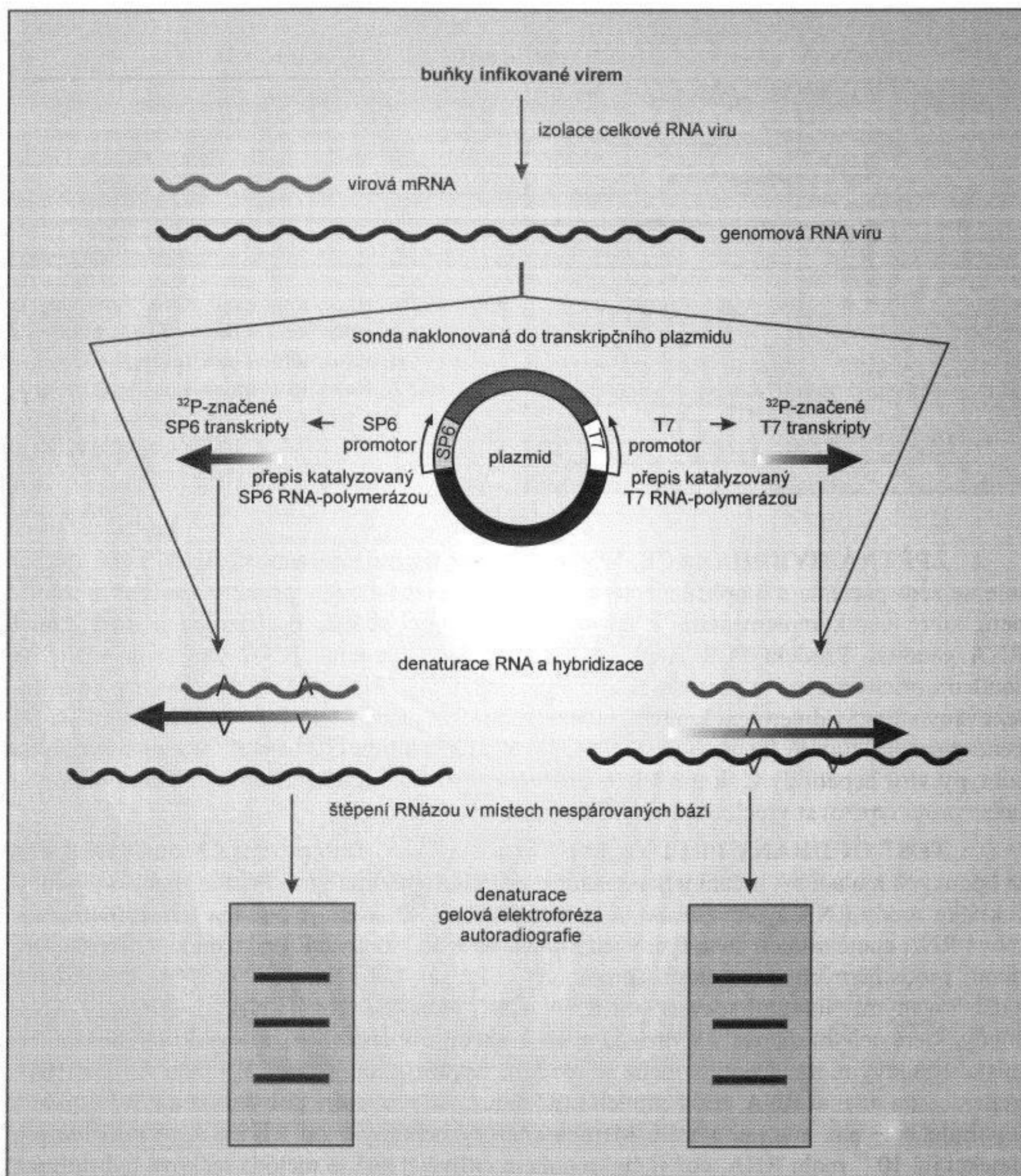


Obr. 102 Detekce fragmentů RNA vytvořených po působení RNázy T1 u polioviru dvourozměrnou elektroforézou. A. Rozdělení fragmentů RNA v prvním směru B. Elektroforetogram fragmentů RNA z dráhy genomové RNA kmene C3 ve druhém směru.

ZPĚTNÁ HYBRIDIZACE. Výchozím materiálem je genomová RNA, která se izoluje ze séra pacienta a amplifikuje se v odstupňované RT-PCR s primery značenými biotinem, které jsou komplementární k sekvencím nekódující oblasti, nacházející se na 5'-konci RNA genomu. Produkt PCR amplifikovaný ze vzorku genomu RNA viru hybridizuje se sondami přichycenými v paralelních liniích k membráně. Hybridizované sekvence jsou detekovány streptavidinem navázaným na alkalickou fosfatázu. Metoda se používá zejména při genotypizaci flavivirů (např. *Hepacivirus*, původce hepatitidy C). Je však omezena pouze na subtypy viru hepatitidy C, k nimž jsou známé a komerčně dostupné sondy. Touto metodou nelze proto typizovat všechny existující viry rodu *Hepacivirus*.

TEST OCHRANY PŘED ÚČINKEM RNÁZY A. Tato metoda se používá k detekci bodových mutací a k určení jejich lokalizace v RNA genomu virů. Postup spočívá v použití krátké sondy RNA syntetizované *in vitro* a značené ^{32}P , která je získána transkripcí genomové RNA standardních nebo typových kmenů virů. Je klonovaná v plazmidu a přepsaná ze dvou protisměrných promotorů (promotory SP6 a T7). Sonda ^{32}P -RNA hybridizuje s detekovanými cílovými sekvencemi RNA. Části jednořetězcové RNA, tj. sekvence RNA sondy, které nehybridizovaly s virovou mRNA anebo s oblastmi genomové RNA, obsahující místa s bodovými mutacemi, v nichž se sonda nenavázala, se odstraní RNázou A (obr. 103). Separace fragmentů RNA, rezistentních k RNáze A, se provádí v polyakrylamidovém gelu a jejich detekce pak autoradiografií. Metoda analýzy ochrany proti RNáze A se používá pro detekci již 10^{-19} molu RNA, což ji činí mnohem citlivější než je metoda tečkové hybridizace nebo northernový přenos.

Metoda analýzy ochrany proti RNáze A se používá k určení příbuznosti RNA virů nebo k rozlišení transkriptů s různými 3'-konci. Molekuly RNA, které se liší inzercí, delecí nebo přítomností bodových mutací mohou být snadno odlišeny, jestliže vzdálenosti mezi genetickými změnami dosahují alespoň 7 nukleotidů. Z enzymů se nejčastěji používá RNáza A, která štěpí nukleotidový řetězec v místech bází C, G a U. Fragmenty vzniklé štěpením RNázou A vytvářejí na gelu neostře ohraničené proužky. Při mapování míst, v nichž se nacházejí genetické změny, je zapotřebí mít řadu sond, které pokrývají celý virový genom.

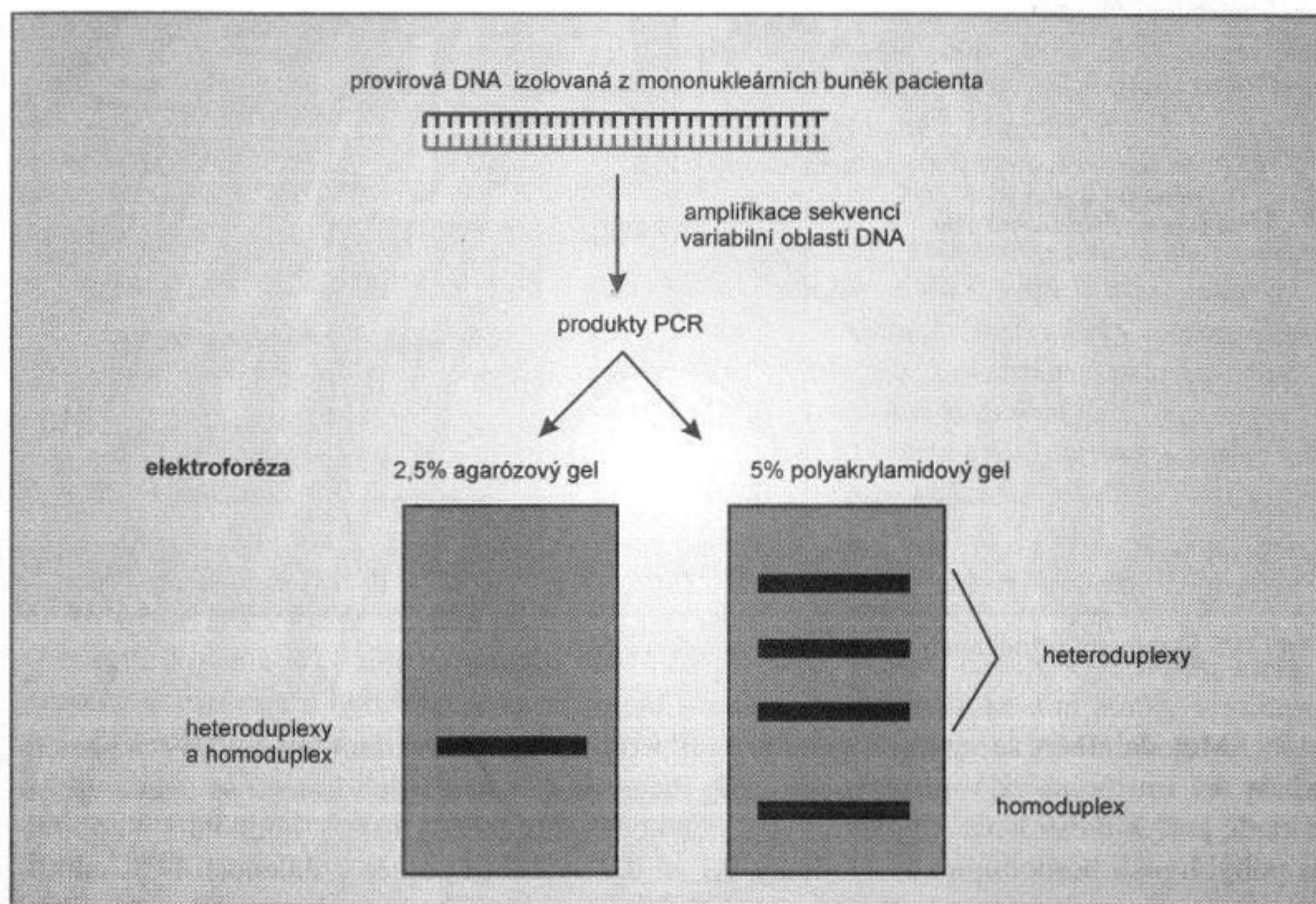


Obr. 103 Analýza genetické variability kmenů paramyxoviru RSV prostřednictvím testu ochrany před účinkem RNázy A

ANALÝZA KONFORMAČNÍHO POLYMORFIZMU JEDNOŘETĚZCŮ (SSCP). Analýza SSCP, kterou popsali Orita a spolupracovníci, je založená na skutečnosti, že genetická změna v jednotlivých nukleotidech způsobuje změnu pohyblivosti fragmentů ssDNA v gelu. Metoda spočívá v amplifikaci specifických oblastí referenčního a mutantního genomu metodou RT-PCR a v následné denaturaci a separaci produktů PCR elektroforézou v neutrálním polyakrylamidovém gelu. Pohyblivost ampliconů obou vzorků genomu je odlišná (str. 57). Metoda vyžaduje optimalizaci podmínek detekce. SSCP se používá k analýze genetické variability u nestrukturních genů lidského parvoviru B19 (původce 5. nemoci) a

umožnila identifikaci šesti genotypů tohoto parvoviru v celosvětovém měřítku. Metoda se též používá v epidemiologii infekcí způsobených virem hepatitidy B (HBV) a virem hepatitidy C.

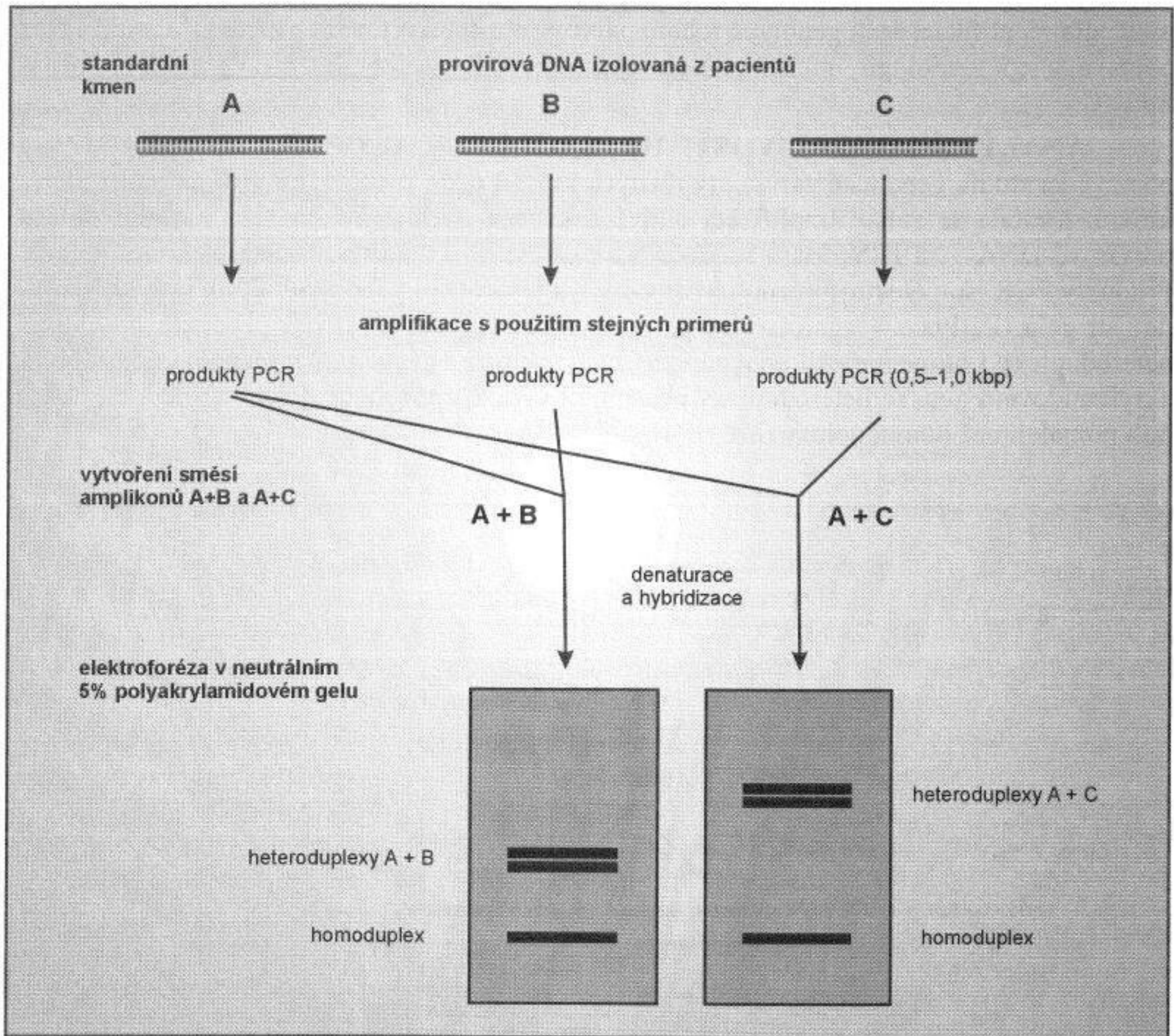
ANALÝZA POHYBLIVOSTI HETERODUPLEXŮ (HMA). Metoda HMA se používá ke studiu genetické variability různých kmenů nebo kvazidruhů virů na molekulární úrovni. Metoda se zahájí amplifikací cílové sekvence nacházející se ve variabilní oblasti provirové DNA viru HIV, která se izoluje z periferních krevních mononukleárních buněk. Produkty PCR jsou elektroforézou separovány v agarózovém nebo neutrálním polyakrylamidovém gelu. Zatímco v agarózovém gelu se směs nedenaturovaných produktů obsahující heteroduplexy i homoduplexy pohybují stejnou rychlostí a zastaví se v jedné pozici, v polyakrylamidovém gelu se heteroduplexy obsahující výdutě způsobené delecí nukleotidů pohybují pomaleji než homoduplexy (obr. 104).



Obr. 104 Analýza pohyblivosti heteroduplexů

Při studiu diverzity kmenů HIV se směs produktů PCR z různých izolátů HIV denaturuje a hybridizuje s amplifikovanou DNA standardního (typového) HIV kmene se známou sekvencí (obr. 105).

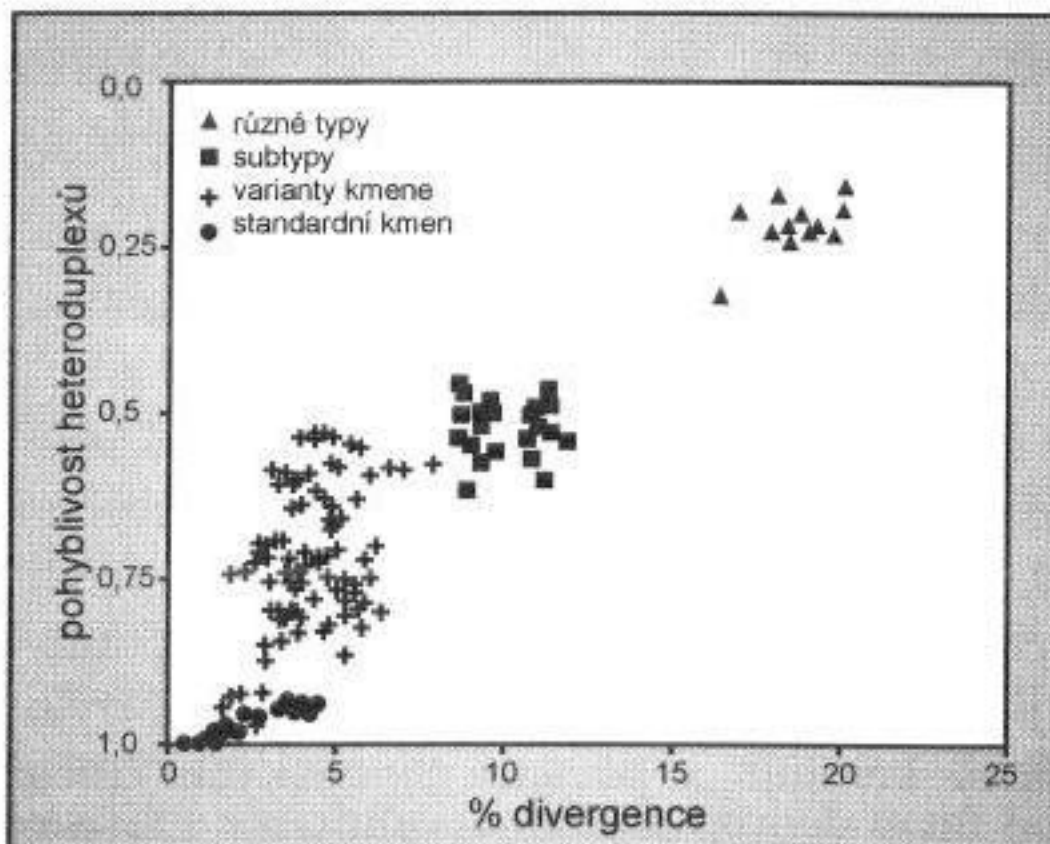
Jestliže se smísí dva odlišné amplikony o stejné velikosti, pak se po elektroforéze v neutrálním polyakrylamidovém gelu obvykle objeví tři produkty; jeden představuje homoduplexy a dva pomaleji se pohybující proužky obsahují heteroduplexy. Smíchají-li se tři odlišné amplikony, které se denaturují a znovu renaturují, objeví se v gelu celkem šest pomaleji se pohybujících produktů, které představují všechny kombinace heteroduplexů. Bylo prokázáno, že snížení pohyblivosti heteroduplexů koreluje s počtem genetických změn v nukleotidech.



Obr. 105 Stanovení příbuznosti kmenů HIV metodou HMA

Metoda HMA se využívá k analýze příbuznosti různých variant kmenů HIV u pacienta, ale též i u jiných HIV-pozitivních osob. Příbuznost jednotlivých kmenů se stanovuje na základě pohyblivosti heteroduplexů vyjádřené hodnotami od 0,1 do 0,9 (hodnota 1,0 odpovídá pohyblivosti homoduplexů). Hodnoty 0,1 až 0,9 vyjadřují poměr vzdálenosti PCR ampliconu heteroduplexu ke vzdálenosti PCR ampliconu homoduplexu v gelu od startu.

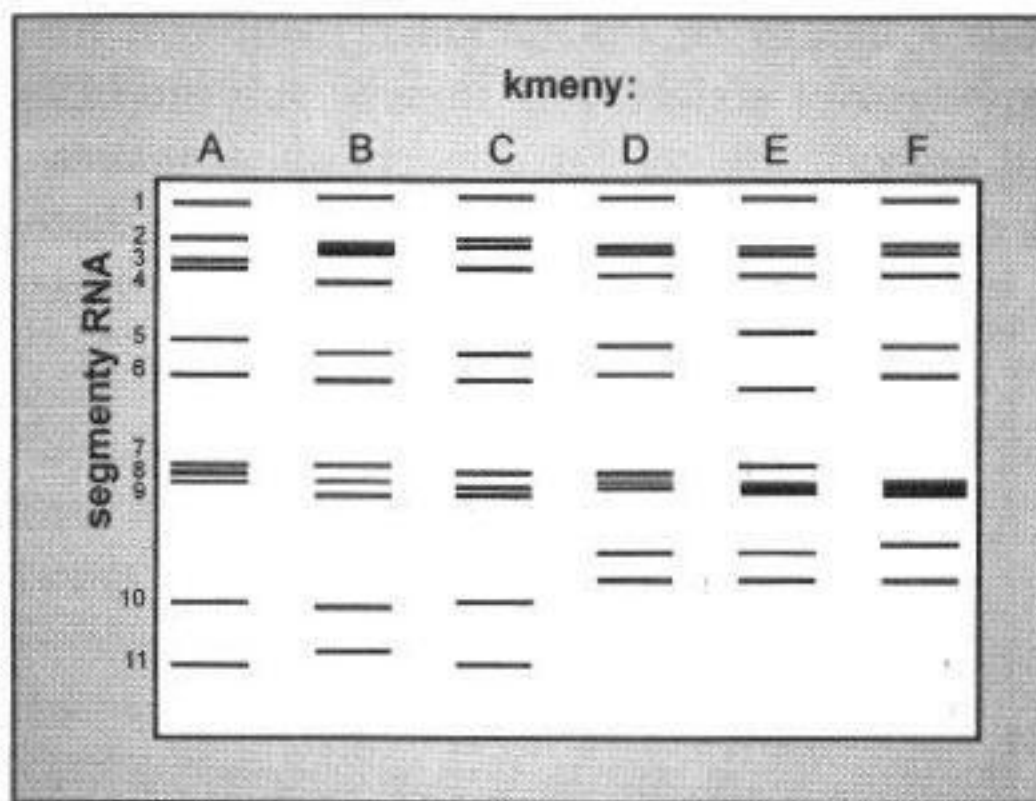
Touto metodou byly studovány a porovnávány typy HIV izolované v USA s příbuznými typy HIV izolovanými v Africe (obr. 106).



Obr. 106 Stanovení příbuznosti HIV izolátů metodou HMA

Metoda HMA se používá rovněž ke stanovení příbuznosti kmenů viru chřipky A. Variantou metody HMA je test stopování heteroduplexů „heteroduplex tracking assay“ (HTA), který se používá k detekci kvázidruhů HIV. Tento test spočívá v detekci heteroduplexů, které se vytvoří mezi produkty PCR z amplifikovaných sekvencí genu *env* z genomů několika izolátů HIV, získaných v průběhu infekce od jednoho pacienta, hybridizací s radioaktivně značenou sondou. Ta je připravena klonováním specifické oblasti genu *env* provirové DNA standardního kmene HIV.

POLYMORFIZMUS DÉLKY GENOMOVÝCH SEGMENTŮ (GSLPA). Metoda GSLPA je určena k typizaci virů, které mají segmentovaný genom, tvořený negativními řetězci RNA. Metoda se používá především u rotavirů (původci průjmových onemocnění).

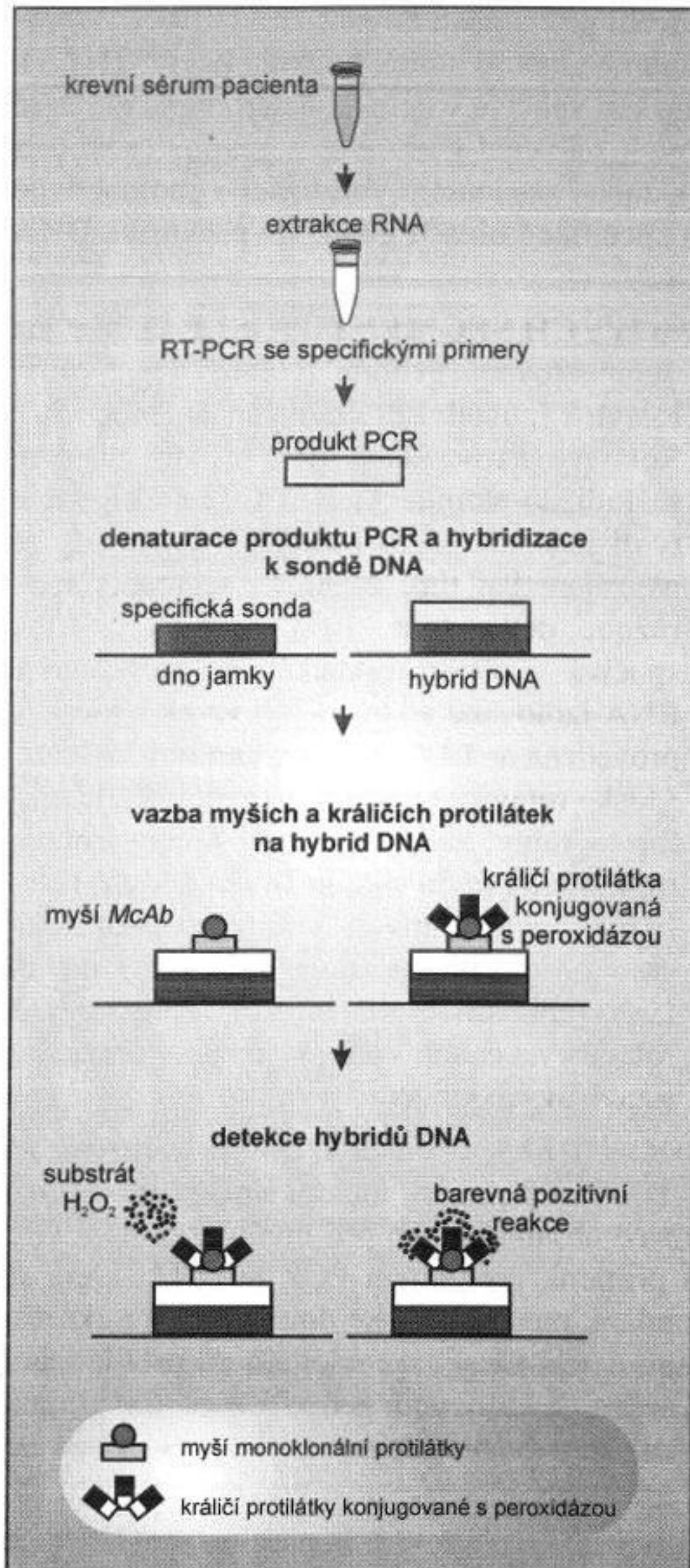


Obr. 107 Genotypizace rotavirů metodou polymorfizmu délky genomových segmentů

Rotaviry (*Reoviridae*), které infikují člověka, se řadí do skupin A, B a C. Jejich genom tvoří jedenáct segmentů dsRNA. Kmeny se navzájem liší tím, že jejich segmenty mají různou délku (obr. 107). Metoda GSLPA spočívá v elektroforetické analýze celkové RNA izolované z klinických vzorků, která je provedena v 10% polyakrylamidovém gelu. Lidské rotaviry mají obvykle dlouhé elektroforetogramy, zatímco ostatní kmeny rotavirů, řadících se do skupin D až G, které neinfikují člověka mívají krátký elektroforetogram. Metoda umožňuje studovat molekulární epidemiologii infekcí způsobených rotaviry na celém světě, zejména v ohniscích rotavirových epidemií.

DETEKCE HYBRIDU DNA METODOU DEIA. Metoda DEIA je založena na imunologické detekci hybridu dvouřetězcové DNA. Výchozím materiálem je genomová RNA izolovaná z krevního séra pacienta. Sekvence obsahující gen pro dřevový protein viru je amplifikovaná RT-PCR za použití vnitřních primerů. Produktem PCR je DNA, která se tepelně denaturuje a hybridizuje ke známým sondám, navázaných ke dnu jamky v mikrotitrační destičce. Hybridy dvouřetězcové DNA jsou detekovány monoklonálními protilátkami proti DNA a králičími protilátkami konjugovanými s křenovou peroxidázou. Po přidání chromogenního substrátu (např. peroxidu vodíku) se u pozitivních vzorků objeví zbarvení (obr. 108).

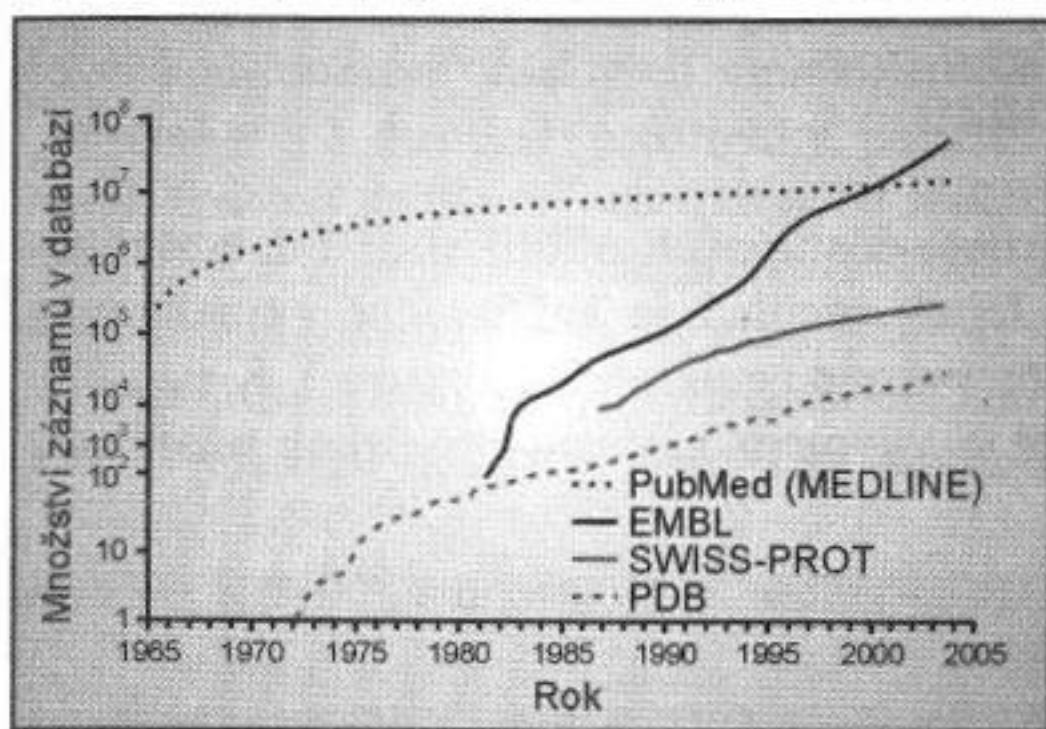
Tato metoda se používá při molekulární typizaci izolátů viru hepatitidy C (HCV). Je však omezena počtem sond připravených ze známých subtypů tohoto flaviviru.



Obr. 108 Detekce hybridu DNA metodou DEIA

X. Bioinformatika

Bioinformatika je nová disciplína na rozhraní počítačových věd, informačních technologií, matematiky a biologie a zahrnuje studium a praktické uchovávání, vyhledávání, zobrazování, manipulaci a modelování biologických dat (Tabulka 6). Vývoj vysoce výkonných technologií jako např. automatické sekvencování, MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie a NMR spektroskopie či proteinová krystalografie, umožňujících získání molekulárně biologických dat přispěl k jejich dramatickému nárůstu (obr. 109) a tím současně zvýšil náročnost jejich zkoumání a hodnocení ve vztahu k biologickým otázkám. Potřeba pracovat s velice obsáhlými databázemi si vyžádala vývoj výpočetních nástrojů umožňujících analýzu dat a stanovení jejich vzájemných vztahů. Termín bioinformatika se objevil poprvé až v roce 1991 a představuje spojení technologií z oblasti molekulární biologie a oblasti informačních technologií, u nichž došlo v posledních letech



Obr. 109 Kumulativní nárůst dat z oblasti bioinformatiky a výkonnosti počítačů ilustrovaný na příkladu počtu záznamů v několika klíčových databázích

k explozivnímu růstu nových poznatků. Neodmyslitelnou součástí infrastruktury bioinformatiky je komunikační prostředek umožňující rychlý přenos obrovského množství dat a současně všeobecná dostupnost těchto dat pro tisíce lidí. V závěru dvacátého století se tímto prostředkem stal **Internet** a obecně používaným rozhraním je webový prohlížeč, umožňující pracovat s hypertextovými a hypergrafickými prezentacemi, včetně výpočetních nástrojů podstatně přispívajících ke stanovení vztahů, struktury a funkce informačních biomakromolekul a jejich role v biologických procesech.

Tabulka 6 Základní zdroje a aplikace bioinformatiky

Výpočetní základy	Zdroje dat	Aplikace bioinformatiky
Algoritmy	Obecně dostupné databáze	Získávání dat
Grafika, vizualizace		Nástroje pro přístup k databázím
Zpracování signálu		Mapování a srovnávání genomů
Architektura hardwaru		Seřazení sekvencí
Informační teorie		Identifikace genů
Správa databází		Funkční identifikace proteinů
Statistika		Molekulární evoluce
Simulace		Molekulární modelování
Umělá inteligence		Predikce struktur
Zpracování obrazu		Srovnávání struktur
Robotika	Zpracování laboratorních dat	Stanovení makromolekulárních struktur
Softwarové inženýrství		Vývoj léčiv na základě struktur

Mezi hlavní oblasti zájmu bioinformatiky patří studium širokého rozmezí biologických dat, zejména sekvencí nukleových kyselin a proteinů, genů a genových map, expresních profilů a organizace genomů, a také interakce proteinů nebo mechanismy fyziologických funkcí. Primárním cílem těchto analýz je objasnění informačního obsahu těchto biomakromolekul a porozumění, jak bioinformace přímo ovlivňují vývoj a funkce u živých organismů. Metody bioinformatiky se tedy stávají spolu se zvyšujícím se množstvím kompletních genomových sekvencí základem pro detekci systémového chování buněk a organismů. Znalost genomů a proteomů mnoha různých druhů a vzorky sekvencí z populací poskytují navíc základ pro evoluční studie.

Ve sféře biotechnologií a medicíny je další důležitou stránkou bioinformatiky přístup k publikované vědecké literatuře a k patentovým archivům. Jednou z největších databází na světě je **MEDLINE**, obrovský archiv odkazů z biologických a biomedicinských odborných časopisů pokrývajících období od roku 1965 do současnosti a poskytující kromě abstraktů také odkazy na celé texty článků u jednotlivých vydavatelů.

1. Molekulárně biologické databáze

V současné době je prostřednictvím Internetu dostupných přibližně 550 databází zabývajících se shromažďováním bioinformací. Jejich přehled je každoročně aktualizován v časopise *Nucleic Acids Research* (URL <http://www.oup.co.uk/nar/database/a/>). K nejdůležitějším institucím zabývajícím se, správou dat a vývojem nástrojů pro jejich analýzu a poskytováním informací patří:

- **Evropský institut pro bioinformatiku (EBI)** se sídlem v Hinxtonu ve Velké Británii (URL <http://www.ebi.ac.uk/>),
- **Národní centrum pro biotechnologické informace (NCBI)** založené původně v rámci Národní lékařské knihovny (NLM) v USA (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),
- **Centrum pro informační biologii (CIB)** založené jako oddělení **Národního genetického institutu (NIG)** v Mishimě, Japonsko (URL <http://www.cib.nig.ac.jp/>).

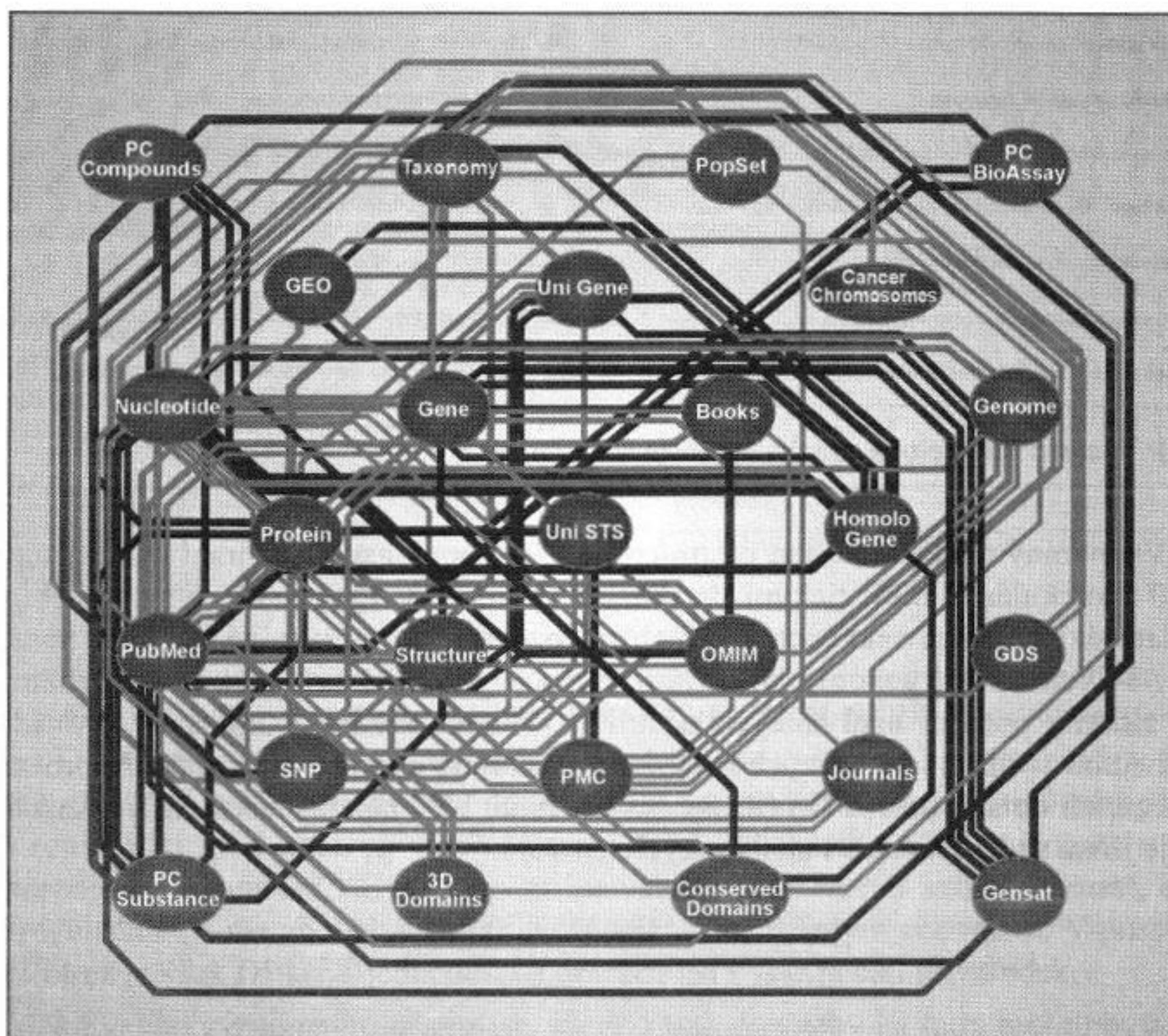
V každém z těchto tří center je spravována **genomová databáze** sekvencí nukleových kyselin a odpovídajících, z nich přeložených proteinů. Tři samostatné databáze vznikly v důsledku potřeby rychlé dostupnosti databáze sekvencí na jednotlivých kontinentech v době, kdy ještě nebyly rozvinuté vysokorychlostní komunikační sítě. V současné době si jednotlivé databáze předávají získaná data, takže databanky GenBank/EMBL/DDBJ prakticky sdílejí stejná data v jakoukoli dobu. Jako první databanka na světě schraňující nukleotidové sekvence byla vytvořena v roce 1980 **EMBL Nucleotide Sequence Database** (v rámci institutu EBI) a o dva roky později databanka **GenBank** (v rámci institutu NCBI). Cílem vytvoření databází bylo přimět autory ukládat sekvence přímo v databázi namísto publikování v časopisech, ze kterých byly původně získávány. Prvních 2427 sekvencí týkajících se zejména funkčních RNA (tRNA a rRNA) mikroorganismů, úseků genomu některých bakterií a virů a malého množství eukaryotických mRNA bylo přepsáno do databází z časopisů. Databáze **DDBJ** (The DNA Data Bank of Japan) zahájila činnost v roce 1984 a původně shromažďovala data především z japonských výzkumů, za nedlouho potom však zahájila úzkou spolupráci s ostatními databázemi. V polovině roku 2005 databáze nukleotidových sekvencí EMBL obsahovala > 95 miliard nukleotidů ve více jak 54,1 milionu sekvencí pocházejících celkem od více než 200 000 různých organismů nebo virů. Všechny tři genomové databáze jsou volně dostupné a přijímají data získaná v genomových centrech nebo na odborných pracovištích zabývajících se sekvencováním nukleových kyselin. Nové sekvence

nukleových kyselin se do databází vkládají pomocí speciálního WWW formuláře nazvaného BankIt pro databázi GenBank, WebIn pro databázi EMBL nebo Sakura pro databázi DDBJ.

Sekvence proteinů, u nichž bylo experimentálně stanoveno pořadí jejich aminokyselin, charakterizovány jednotlivé proteinové domény a stanovena jejich funkce, jsou ukládány v databázi **SWISS-PROT** založené na Univerzitě v Ženevě v roce 1986. Databázi spravuje Švýcarský institut pro bioinformatiku (SIB), který se podílí na vytváření sítě propojených databází sekvencí. Kompletní databázi sekvencí proteinů obsahuje SWISS-PROT spolu s doplňkem označeným TrEMBL, který obsahuje automaticky doplňované překlady kódujících oblastí z databáze sekvencí nukleových kyselin EMBL. Další důležitou databází z oblasti molekulární biologie je **PDB** (The Protein Databank), která se zabývá archivací a analýzou proteinových struktur a komplexů informačních biomakromolekul.

2. Textové vyhledávání v databázích

Množství důležitých molekulárně-biologických dat se zvyšuje tak rychle, že je nezbytné mít k dispozici prostředky, pomocí kterých můžeme k těmto datům snadno přistupovat. Existují tři hlavní prostředky na získávání informací, které umožňují vyhledávání v molekulárně biologických databázích. Tyto prostředky jsou vstupním bodem do mnoha integrovaných databází a každý z nich byl vyvinut v jednom ze tří hlavních center pro bioinformatiku. Navzájem se liší v databázích, které mohou prohledávat, ve vazbách, které vytvářejí mezi jednotlivými databázemi a ve vazbách vztahujících se k dalším informacím (obr. 110).



Obr. 110 Ukázka propojení databází na příkladu vyhledávače Entrez

Vyhledávací systém pro molekulárně biologické databáze vyvinutý v NCBI se nazývá **Entrez** (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>). Je vstupním bodem pro průzkum 45 různých integrovaných databází, z nichž řada je virtuálních. K nejvýznamnějším databázím patří databáze PubMed umožňující přístup k literární databázi MEDLINE, databáze sekvencí nukleových kyselin a proteinů, databáze 3-D struktur MMDB (Molecular Modeling Database) odvozená z PDB, skupina databází genomů a taxonomická databáze usnadňující získávání sekvencí na základě taxonomických skupin (obr. 111). Ze tří vyhledávacích prostředků je Entrez uživatelsky nejpřijatelnější, ale zejména ve srovnání se SRS nabízí omezené, avšak pro základní účely postačující vyhledávací prostředky.

The screenshot shows the Entrez search engine interface. At the top left is the NCBI logo. To its right is the Entrez logo and the text "Entrez, The Life Sciences Search Engine". Below this is a navigation bar with links for "HOME", "SEARCH", "SITE MAP", "PubMed", "Entrez", "Human Genome", "GenBank", "Map Viewer", and "BLAST". A search bar is labeled "Search across databases" with "GO" and "CLEAR" buttons. Below the search bar, a message reads "Welcome to the new Entrez cross-database search page". The main content area is a grid of database categories, each with an icon, a description, and a help icon. Categories include PubMed, PubMed Central, Journals, MeSH, Nucleotide, Protein, Genome, Structure, Taxonomy, SNP, Gene, Books, OMIM, Site Search, UniGene, CDD, 3D Domains, UniSTS, PopSet, GEO, and GEO DataSets.

Obr. 111 Výchozí internetová stránka vyhledávače Entrez

Významným databázovým nástrojem je **SRS**, homogenní rozhraní pro přístup k více než 160 molekulárně biologickým databázím vyvinuté v EBI (URL <http://srs.ebi.ac.uk/>). Typy databází zahrnují sekvence a z nich odvozená data, metabolické dráhy, transkripční faktory, 3-D struktury, genomy, mapování, mutace, jednonukleotidové polymorfizmy a výsledky získané pomocí analytických nástrojů. Webové rozhraní umožňuje provádět před vyhledáváním výběr z jednotlivých databází a poskytuje alternativní formuláře pro zadávání vyhledávacích dotazů (obr. 112) (SRS). Na Internetu běží několik verzí SRS a každá z nich obsahuje jinou sadu databází a analytických nástrojů.

SRS
EMBL-EBI

Quick Search Library Page Query Form Tools Results Projects Views Databanks HELP

Reset Quick Search

Search Options

- Select the databanks you want to search
- Enter your search terms in the Quick Search box, or choose a query form from below

Standard Query Form
Extended Query Form

You can browse through all the entries in any databanks. First, select the databanks you want to browse, then click:

Browse Entries

Available Databanks

Expand all Collapse all Show databanks tooltips:

Literature, Bibliography and Reference Databases

Nucleotide sequence databases

EMBL EMBL (Release) EMBL (Updates) EMBL (WGS)
 EMBL (TPA) EMBL (Contig) REFSEQ ENSEMBL HUMAN
 ENSEMBL MOUSE ENSEMBL FLY ENSEMBL FISH IMGTHLA
 IMGTL/IGM-DB PATENT_DNA LiveLists

UniProt Universal Protein Resource

UniProt UniParc UniRef100 UniRef90 UniRef50
 UniProt/Swiss-Prot UniProt/TrEMBL

Other protein sequence databases

IPI REFSEQOP EPO Proteins IPO Proteins
 USPTO Proteins MHCBN BCIPEP SWISSCHANGE

Deprecated Protein Databases

Swall (SPTR) TrEMBL (Updates) RemTrEMBL PIR

Nucleotide related databases

CPGISLAND ENSEMBLCPG EPD HGNC
 HSAGENES LOCUSLINK MOUSE2HUMAN REBASE
 TFCLASS TFCELL TFFACTOR TFGENE
 TFMATRIX TFSITE UNIGENE UNILIB
 UTR UTRSITE EMBLALIGN

Protein function databases

BLOCKS INTERPRO IPRMATCHES
 IPRMATCHES_ENSEMBL NICEDOM PEP (ORFs)
 PFAMA PFAMB PFAMSEED
 PFAMHMMFS PFAMHMLS PRINTS
 PRODOM PROSITE PROSITEDOC

Protein structure databases

DSSP ESSP HSSP PDB PDBFINDER
 RESID

Enzymes, reactions and metabolic pathway databases

EMP ENZYME LCOMPOUND LENZYME LREACTION
 MPW PATHWAY UCOMPOUND UENZYME UIMAGEMAP
 UPATHWAY UREACTION

Mutation and SNP databases

Gene ontology resources

Mapping databases

Other databases

User owned databases

Application result databases

EMBOSS result databases

Tips

- bookmark this link to return to your project
- Linking to SRS?
- Please read this document for important information regarding linking to our SRS server.

BookMarklets

About BookMarklets

- Protein Seq
- DNA/RNA Seq
- Structures


SRS Release 7.1.1 Copyright © 1997-2003 LION bioscience AG. All Rights Reserved. [Terms of Use](#) [Feedback](#)

Obr. 112 Výchozí internetová stránka vyhledávače SRS

V Institutu pro chemický výzkum na Univerzitě Kyoto v Japonsku byl vyvinutý integrovaný systém pro získávání dat z databází **DBGET/LinkDB** (URL <http://www.genome.ad.jp/dbget/>). Poskytuje přístup do přibližně 40 databází, které mohou být dotazovány samostatně. Jako výsledek DBGET prezentuje kromě seznamu vyhledaných záznamů také přehled vazeb na související informace ve všech integrovaných databázích. Další ojedinělou vlastností je propojení na databázi KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), což je databáze regulačních a metabolických drah u organismů ze známým genomem. V porovnání se SRS a Entrez je však DBGET jednodušší a omezenější vyhledávací prostředek.

Dalším velice významným nástrojem, který obsahuje vazby na řadu proteinových databází, je proteomický server Švýcarského institutu pro bioinformatiku nazvaný **ExpASY**

(URL <http://www.expasy.ch/>), nabízející kromě možností vyhledávání řadu analytických pomůcek (obr. 113).

Site Map	Search ExPASy	Contact us
Search <input type="text" value="Swiss-Prot/TrEMBL"/> for <input type="text"/> <input type="button" value="Go"/> <input type="button" value="Clear"/>		
 <h2 style="display: inline;">ExPASy Molecular Biology Server</h2> <p>The ExPASy (Expert Protein Analysis System) proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) is dedicated to the analysis of protein sequences and structures as well as 2-D PAGE (Disclaimer / References).</p> <p style="text-align: center;"> [Announcements] [Job opening] [Mirror Sites] </p>		
Databases	Tools and software packages	
<ul style="list-style-type: none"> • Swiss-Prot and TrEMBL - Protein knowledgebase • PROSITE - Protein families and domains • SWISS-2DPAGE - Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis • ENZYME - Enzyme nomenclature • SWISS-3DIMAGE - 3D images of proteins and other biological macromolecules • SWISS-MODEL Repository - Automatically generated protein models • CD40Lbase - CD40 ligand defects • SeqAnalRef - Sequence analysis bibliographic references • Links to many other molecular biology databases 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteomics and sequence analysis tools <ul style="list-style-type: none"> ◦ Proteomics [Peptident, PeptideMass, ...] ◦ DNA -> Protein [Translate] ◦ Similarity searches [BLAST] ◦ Pattern and profile searches [ScanProsite] ◦ Post-translational modification and topology prediction ◦ Primary structure analysis [ProtParam, pI/MW, ProtScale] ◦ Secondary and tertiary structure prediction [SWISS-MODEL, Swiss-PdbViewer] ◦ Alignment [T-COFFEE, SIM] ◦ Biological text analysis • Melanie 4 - Software for 2-D PAGE analysis • Roche Applied Science's Biochemical Pathways 	
Education and services	Documentation	
<ul style="list-style-type: none"> • The ExPASy FTP server • Swiss-Shop - automatically obtain (by email) new sequence entries relevant to your field(s) of interest • Masters Degree in Bioinformatics • Proteomics courses - two courses covering Separation Sciences & Mass Spectrometry for Proteomics • SWISS-2DSERVICE - get your 2-D Gels performed according to Swiss standards 	<ul style="list-style-type: none"> • What's New on ExPASy • SWISS-FLASH electronic bulletins • Swiss-Prot documents • How to create HTML links to ExPASy • Complete table of available documents 	
Links to lists of molecular biology resources	Links to some major molecular biology servers	
<ul style="list-style-type: none"> • Amos' WWW links - The ExPASy list of Biomolecular servers • BioHunt - Search the internet for molecular biology information • WORLD-2DPAGE - Links to 2-D PAGE database servers and 2-D PAGE related servers and services • 2D Hunt - 2-D electrophoresis finder • CMS-SDSC - The CMS-SDSC Molecular Biology Resource • Biology links - from Harvard University • BioWorld - from the EBI • Yahoo - Science: Biology 	<ul style="list-style-type: none"> • European Bioinformatics Institute (EBI) • National Center for Biotechnology Information (NCBI) • Japanese GenomeNet • Australian National Genomic Information Service (ANGIS) • ISREC bioinformatics group • BIOSCI/bionet Electronic Newsgroup Network for Biology • EMBNet 	
Miscellaneous	Local links	
<ul style="list-style-type: none"> • Protein Spotlight • Links to conferences and events • Swiss-Quiz • Swiss-Jokes 	<ul style="list-style-type: none"> • Geneva and Swiss local pages • Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) • The Health On the Net foundation (HON) • Geneva Bioinformatics (GeneBio) • GeneProt • Protéines à la «Une» 	

Obr. 113 Výchozí internetová stránka proteomického serveru ExPASy

3. Vyhledávání podobností sekvencí

Pro stanovení podobnosti sekvencí nukleotidů v nukleových kyselinách a aminokyselin v molekulách proteinů se používají nástroje pro seřazení („alignment“) těchto sekvencí. Tyto nástroje mohou být použity i k dalším účelům jako je stanovení jejich struktury a evoluce. Sekvence mohou být srovnány buď na základě celkového nebo lokálního seřazení v závislosti na účelu tohoto srovnání. Běžnou otázkou, která vyvstane po sekvencování nových genů je, zda-li je podobná nebo shodná sekvence již známá a vyskytuje se v současných databázích. Rovněž při sestavování sekvencí rozpracovaných genomů do ucelených kontigů, a v konečné fázi celých genomů, se uplatňuje vyhledání shodných, překrývajících se úseků náhodných fragmentů sekvencí nukleových kyselin. Nejčastěji používané algoritmy pro případy tohoto **lokálního seřazení sekvencí** jsou velmi rychlé algoritmy programů **BLAST** (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) nebo **FASTA** (URL <http://www.ebi.ac.uk/fasta3/>), využívající heuristickou strategii založenou na hledání úseků sekvencí vykazujících nejvyšší stupeň podobnosti. Při srovnávání sekvencí nukleových kyselin variantou programu BLAST (BLASTN) je soubor všech sousedících x -merů (kde x je délka fragmentu sekvence (okno) zpravidla nastavená na hodnotu 11) postupně srovnáván s každou sekvencí v databázi. Nalezené shodné oblasti jsou potom rozšiřovány v obou směrech s použitím méně přísných podmínek pro nalezení shody. Během seřazení sekvencí jsou do sekvencí vkládány mezery tak, že úseky s úplnou nebo částečnou homologií jsou seřazeny nad sebou a navíc mohou být maskovány oblasti s nízkou komplexitou včetně definovaných repetitivních sekvencí (obr. 114). K posouzení významnosti shody nalezených úseků se používá numerická hodnota označovaná jako **skóre seřazení sekvencí (S)**, která popisuje celkovou kvalitu seřazení sekvencí na základě porovnání pravděpodobnosti výskytu nalezených segmentů o určité sekvenční podobnosti s pravděpodobností, že se taková podobnost vyskytne mezi dvěma náhodnými sekvencemi. Vyšší číslo potom odpovídá vyšší podobnosti. Ekvivalentem skóre S je **hodnota E** („Expectation value“), která vyjadřuje počet různých seřazení sekvencí se skórem shodným nebo vyšším než je hodnota S , jejíž výskyt je očekáván při náhodném vyhledávání v databázi. Potom platí, že čím je hodnota E nižší, tím je skóre významnější. Jak sada programů BLAST, tak FASTA umožňují i další možnosti srovnání nukleotidových nebo aminokyselinových sekvencí s údaji v databázích včetně porovnání translačních produktů všech čtecích rámců dotazované sekvence nebo celé databáze (tabulka 7).

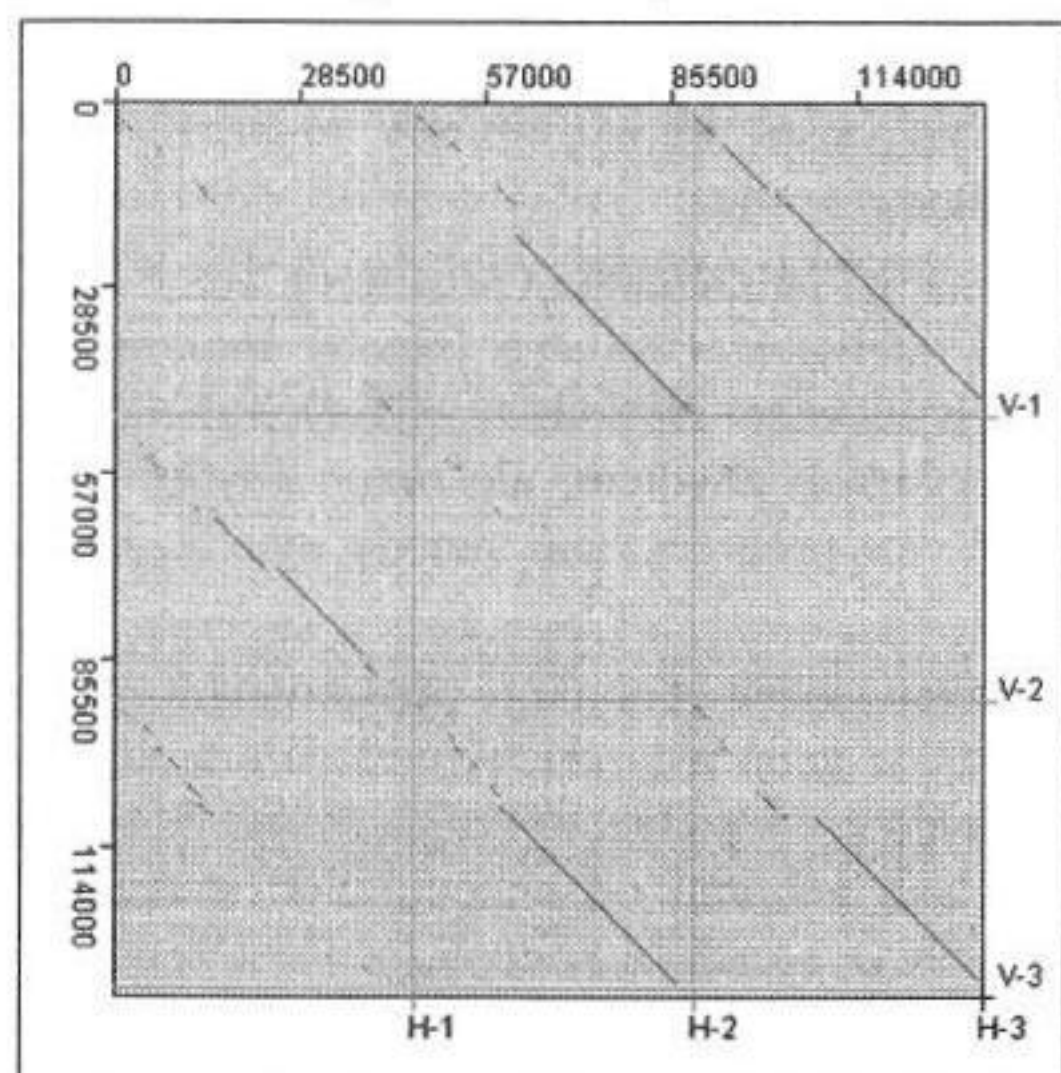
Tabulka 7 Využití jednotlivých variant programů BLAST

Program	Dotaz	Databáze	Úroveň srovnání	Použití
blastn	DNA	DNA	DNA	Hledání identických sekvencí DNA
blasp	Protein	Protein	Protein	Hledání homologních proteinů
blastx	DNA*	Protein	Protein	Hledání genů a homologních proteinů na nové DNA
tblastn	Protein	DNA*	Protein	Hledání genů u necharakterizovaných DNA
tblastx	DNA*	DNA*	Protein	Studium struktury genů

Poznámka: * jsou srovnávány přeložené sekvence DNA ve všech čtecích rámcích

genomových databázích, které obsahují většinu známých sekvencí nukleových kyselin, což je vhodné při hledání nových dosud necharakterizovaných genů, nebo v databázích STS a EST (kapitola IV), což je vhodné při hledání nových homologických genů, při analýze exprese nebo lokalizaci na genomových mapách.

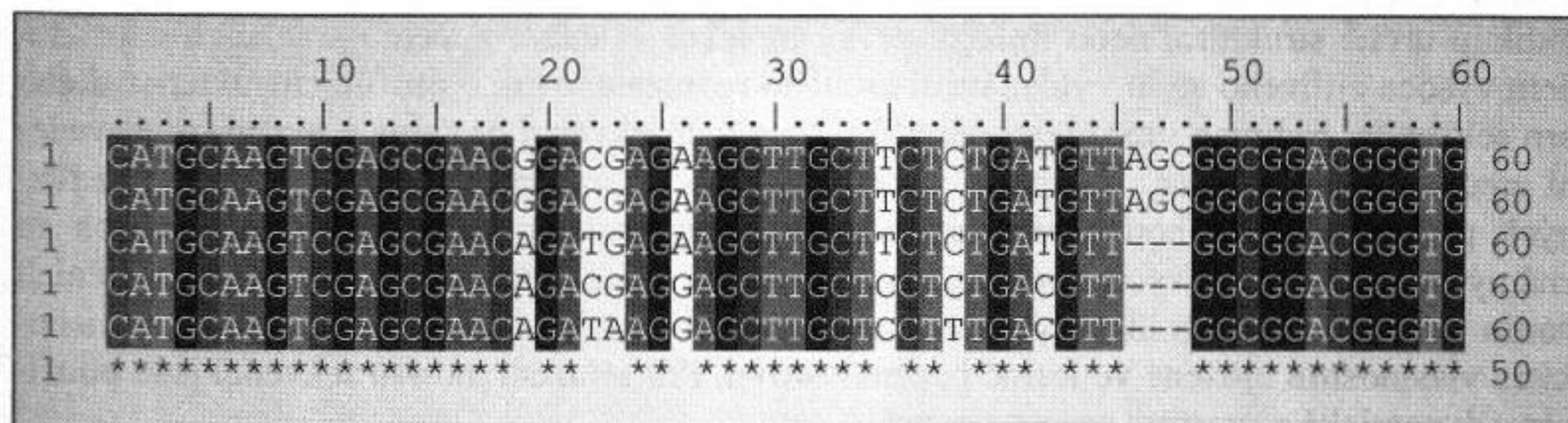
Pro detailní celkové srovnání dvou nukleotidových nebo proteinových sekvencí se lze použít metodu grafického vykreslení **tečkové matice**, ve které je každý zbytek z jedné sek-



vence srovnáván s každým zbytkem ve druhé sekvenci. První sekvence tvoří osu x a druhá sekvence osu y. V oblastech, kde jsou si obě sekvence navzájem podobné tvoří řádek vysokých skóre diagonální linii přes tečkovou matici, podobné sekvence pak tvoří přerušované diagonální linie. Výsledkem je grafické vykreslení podobností sekvencí ve formě čtvercové nebo trojúhelníkové matice zobrazené v šedé škále (obr. 115).

Obr. 115 Příklad celkového vizuálního srovnání sekvencí označených V-1, V-2 a V-3 se sekvencemi H-1, H-2 a H-3 formou grafického znázornění podobností prostřednictvím tečkové matice

Dalším krokem v analýze sekvencí je jejich **mnohonásobné seřazení**, představující srovnání tří a více sekvencí s mezerami vloženými do sekvencí tak, že úseky sekvencí s úplnou nebo částečnou homologií jsou seřazeny ve stejném sloupci (obr. 116). To může odhalit funkci genů, která není jasná z jednotlivých homologií sekvencí. Základní program používaný pro mnohonásobné seřazení sekvencí je ClustalW. Specializované softwary pak mohou na základě mnohonásobného seřazení sekvencí vybrat **profily**, které zahrnují pozičně specifickou informaci, která je odvozená od frekvence, se kterou se každý zbytek vyskytuje v daném sloupci. Skupiny sekvencí s určitou příbuzností jsou charakterizovány obvykle určitými konzervativními motivy a tato informace v mnoha případech umožňuje citlivé vyhledávání v databázích. Metody pro mnohonásobné seřazení sekvencí mohou být navíc rozvinuty do oblasti důležité pro fylogenetické analýzy a srovnávací genomiku.



Obr. 116 Příklad mnohonásobného seřazení sekvencí programem ClustalW

4. Vyhledávání genů a funkčních oblastí

Jednou z důležitých otázek analýzy sekvencí nukleových kyselin je způsob, jakým detekovat kódující oblasti genomové DNA. Mezi klíčové prvky, které jsou vyhledávány počítačovými metodami, patří iniciační a terminační kodony, místa sestřihu, promotory a terminátory transkripce, polyadenylační místa, vazebná místa pro ribozómy (RBS), vazebná místa pro topoizomerázy typu II, místa štěpení pro topoizomerázy typu I a vazebná místa pro transkripční faktory. Takováto místa se nazývají **signály**. Vedle toho existují metody pro vyhledávání delších úseků genomu s variabilní délkou jako např. exony, introny, repetice, nebo geny pro funkční RNA, které tvoří **obsahovou složku** genomu.

Metody pro vyhledávání signálů jsou založené na jednoduchém principu hledání konvenční sekvence spolu s možnostmi přípustných odchylek. Citlivější metody mohou být založeny namísto hledání signálů jako konvenčních sekvencí na použití vážených matic, ve kterých každá pozice vzoru připouští shodu s jakýmkoli zbytkem, ale různé zbytky mají v každé pozici přiřazenou jinou významnost. Ještě více propracované metody využívají statistické přístupy jako např. neuronové sítě.

Nejdůležitější metodou pro hledání obsahových složek genomu je předpovídání kódujících oblastí. U prokaryot je možné lokalizovat většinu genů jednoduchým hledáním otevřených čtecích rámců doplněným např. hledáním signálů pro vazebná místa ribozómu. U eukaryot jsou používány pro rozlišení kódujících oblastí genomu od nekódujících statistické modely frekvencí nukleotidů a závislostí přítomných ve struktuře kodonů. Nejčastěji používané statistické modely jsou známy jako **Markovovy modely**, využívané např. programem GeneMark. Integrované metody pro vyhledávání genů navíc zvažují skryté proměnné spojené s každým nukleotidem v konkrétní pozici; např. zbytek G může být součástí 5'-místa sestřihu nebo třetí pozice iniciačního kodonu a zbytek A může být součástí 3'-místa sestřihu nebo místa větvení. Takovéto modely jsou nazývány **skryté Markovovy modely (HMM)**. Některé systémy pro vyhledávání genů kombinují mnohočetné statistické přístupy s hledáním homologie v databázích získaných translací všech čtecích rámců DNA do proteinu. Databáze sekvencí proteinů a databáze EST jsou potom používány pro ověření předpovídaných genů.

5. Klasifikace proteinů

Pro účely efektivní automatické klasifikace a charakterizace proteinů byly vyvinuty **sekundární klasifikační databáze proteinů** shromažďující informace získané z primárních databází sekvencí ve formě charakteristických vzorů aminokyselinových sekvencí, které indikují určité strukturní nebo funkční prvky molekul. Hledání v těchto kolekcích je příkladem vysoce citlivého stylu vyhledávání určitého reprezentativního profilu charakteristického pro sekvenční rodinu a umožňuje identifikaci nových sekvencí proteinů s možností provedení predikce jejich funkce. Databáze charakteristických vzorů proteinů jsou založeny na různých přístupech a mohou obsahovat jednotky typu proteinových **domén** odvozených ze známých 3-D proteinových struktur, proteinové sekvence seřazené do skupin sekvenčních **rodin** na základě jejich identity nebo z těchto rodin extrahované sekvence s charakteristickými vlastnostmi uložené ve formě popisu **motivů**. Pro seřazení motivů sekvencí jsou používány dynamické algoritmy programování.

Výpočetní techniky používané pro vytvoření motivů mohou být rozděleny do čtyř tříd. Standardní metoda tvoří motiv na základě pozorovaných odchylek ve sloupcích mnoho-

násobného seřazení aminokyselinových sekvencí dané rodiny. Jiné techniky využívají automaticky se zdokonalující algoritmy, které se pokouší vytvořit motivy bez nutnosti mnohonásobného seřazení. Metody skrytých Markovových modelů se snaží umístit dostupná data na sekvenci s použitím místních optimalizačních algoritmů na základě pravděpodobnosti distribucí. A konečně některé techniky jsou tvořeny opakujícími se algoritmy, které zobecňují motiv opakovaným hledáním sekvence v databázi a používají vyvíjející se motiv.

V současné době tvoří několik původně nezávislých sekundárních proteinových databází (PROSITE, Pfam, PRINTS, ProDom, SMART a TIGRFAMs) konsorcium poskytující integrovanou klasifikační databázi proteinů **InterPro**, která je dostupná prostřednictvím webového serveru (URL <http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). Využití InterPro zahrnuje celou řadu biologicky důležitých oblastí, zejména automatické anotace proteinových sekvencí (obr. 117) a několik typů statistických a srovnávacích analýz genomových sekvencí jako hledání ortologních a paralogních genů, analýzu ontologie genů a strukturní informace proteinů.

Mannosyl-glycoprotein endo-beta-N-acetylglucosamidase		
PF01832.8		Endo-beta-N-acetylglucosamidase
SM00047		Lysozyme subfamily
CHAP		
PF05257.2		CHAP domain
PS50911		CHAP
TMP		
PF05017.3		no description
Peptidase M23B		
PF01551.6		Peptidase family M23
t-snare		
SSF47661		t-snare proteins
unintegrated		
PD043582		Q8LTH4_VVVV_Q8LTH4
PD142729		Q8LTH4_VVVV_Q8LTH4
PD484651		Q8LTH4_VVVV_Q8LTH4
PD486456		Q8LTH4_VVVV_Q8LTH4
PD537455		Q8LTH4_VVVV_Q8LTH4
PD552120		O56785_VVVV_O56785
PD585482		Q8LTH4_VVVV_Q8LTH4
PD585534		Q8LTH4_VVVV_Q8LTH4
SSF53955		Lysozyme-like

Obr. 117 Příklad identifikace proteinu bakteriofágového bičíku pomocí integrované klasifikační databáze InterPro

SEZNAM ANGLICKÝCH ZKRATEK

3SR Self-Sustaining Sequence Replication
AFLP Amplification Fragment Length Polymorphism
ALFA Automated Laser Fluorescence analysis
APEX Arrayed Primer EXtension
AP-PCR Arbitrary Primered Polymerase Chain Reaction
ARMS Amplification Refractory Mutation System
ASA Allele-Specific Amplification
ASO Allele Specific Oligonucleotide
AS-PCR Allele Specific Polymerase Chain Reaction
AS-PE Allele-Specific Primer Extension capture
BAC Bacterial Artificial Chromosome
BLAST Basic Local Alignment Search Tool
BLOSUM Block Substitution Matrix
CFLP Cleavase Fragment Length Polymorphism
CGH Comparative Genomic Hybridization
COP Competitive Oligonucleotide Primering
CPT Cycling Probe Technology
DAF DNA Amplification Fingerprinting
ddF Dideoxy Fingerprinting
DDGE Denaturing Detergent Gradient Gel Electrophoresis
DDRT-PCR Differential Display Reverse Transcriptase-PCR
DEAE Diethylaminoethyl
DEIA DNA Enzyme Immunoassay
DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis.
DHFR Dihydrofolate Reductase
DMSO Dimethyl Sulfoxide
DOL Dye-labeled Oligonucleotide Ligation
DOP-PCR Degenerate Oligonucleotide Primered-PCR
D-PCR Degenerate-PCR
DSCP Double-Strand Conformation Polymorphism
EBI European Bioinformatics Institute
EC-PCR Expression Cassette-PCR
EDTA Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid
EMBL European Molecular Biology Laboratory
EMSA Electrophoretic Mobility Shift Assay
ERIC-PCR Enterobacterial Repeated Intergenic Consensus-PCR
ESI Electrospray Ionization
EST Expressed Sequence Tag
ExPASy Expert Protein Analysis System
E value Expectation value
FACS Fluorescence-Activated Cell Sorter
FERP Fluorophore-Enhanced REP-PCR
FIGE Field Inversion Gel Electrophoresis
FISH Fluorescence In situ Hybridization
FRET Fluorescence Resonance Energy Transfer

GFP Green Fluorescent Protein
GPT Guanine Phosphoribosyl Transferase
GSLPA Genome Segment Lenght Polymorphism Analysis
GSS Genome Survey Sequence
HAT Histone Acetyltransferase
HDAC Histone Deacetylase
HGPRT Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyltransferase
HMA Heteroduplex Mobility Assay
HMM Hidden Markov Model
HSV herpes simplex virus
HTA Heteroduplex Tracking Assay
IPCR Inverse Polymerase Chain Reaction
IPTG Isopropyl- β -D-thiogalactoside
IRS-PCR Infrequent-Restriction Site Amplification
ISH *In situ* Hybridization
ISSR Inter-Simple Sequence Repeat amplification
ISTR Inverse Sequence-Tagged Repeats
ITS-PCR Internal Transcribed Spacer-PCR
kb kilo-base pair = 1 000 base pairs
LCR Ligase Chain Reaction
LDR Ligase Detection Reaction
LUX Light Upon eXtension
MAAP Multiple Arbitrary Amplicon Profilng
MALDI Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
MALDI-TOF MS Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass
Spectrometry
MB Molecular Beacons
MLST Multilocus Sequence Typing
MPCR Multiplex PCR
NASBA Nucleic Acid Sequence Based Amplification
NCBI National Center for Biotechnology Information
NLM National Library of Medicine
NMR Nuclear Magnetic Resonance
OLA Oligonucleotide Ligation Assay
ORF Open Reading Frame
PAC P1-derived Artificial Chromosome
PAGE Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PAM Point Accepted Mutation
PAMSA PCR Amplification of Multiple Specific Alles
PASA PCR Amplification of Specific Alles
PCR Polymerase Chain Reaction
PCR-EIA PCR-Enzyme Immunoassay
PCR-ELISA PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
PCR-ISH PCR-*In situ* Hybridization
PCR-OLA PCR followed by Oligonucleotide Ligation Assay
PCR-RFLP PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism
PFGE Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PMSF phenyl-methyl-sulphonyl fluoride
PNA Peptide Nucleic Acid

PRINS Primed *in situ* labelling
QBR Qβ-Replication assay
QC-PCR Quantitative Competitive PCR
QPCR Quantitative PCR
RACE Rapid Amplification of cDNA Ends
RAPD Random Amplified Polymorphic DNA
RBS Ribosomal Binding Site
RCA Rolling Circle Amplification
RDA Representational Difference Analysis
REA Restriction Endonuclease Analysis
REAP Restriction Endonuclease Analysis of Plasmid DNA
REP-PCR Repeat sequence primed PCR
RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism
RISC RNA-Induced Silencing Complex
RPA Ribonuclease Protection Assay
RS-PCR Ribosome Spacer-PCR
RT-PCR Reverse Transcriptase-PCR
SAMPL Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci
SBH Sequencing by Hybridization
SDA Strand Displacement Amplification
SDS Sodium Dodecyl Sulfate
SF-REA Small Fragment Restriction Endonuclease Analysis
SIB Swiss Institute of Bioinformatics
siRNA small interfering RNA
SNP Single Nucleotide Polymorphisms
SPAR Single Primer Amplification Reactions
SRFA Selective Restriction Fragment Amplification
SRFH Selective Restriction Fragment Hybridization
SRS Sequence Retrieval System
SSAP Sequence Specific Amplification Polymorphisms
SSCP Single Stranded Conformational Polymorphism
SSLP Simple Sequence Length Polymorphism
SSR Simple Sequence Repeat
SSSR Self-Sustaining Sequence Replication
STR Short Tandem Repeat
STS Sequence Tagged Site
TAS Transcription-based Amplification System
TGGE Temperature-Gradient Gel Electrophoresis
T_a Annealing Temperature
TK Thymidine Kinase
T_m Melting Temperature
TMA Transcription-Mediated Amplification
URL Universal Resource Locator
VNTR Variable Number Tandem Repeat
XMP Xanthosine 5'-monophosphate
YAC Yeast Artificial Chromosome

REJSTŘÍK

- β -merkaptoetanol, 10
„melting temperature“, 21
„nick translation“, 23
2',3'-dideoxyribonukleosidtrifosfát, 62
2'-deoxyadenozin-5'- α -tio-trifosfát, 69
2'-deoxyuridin-5'-trifosfát, 77
3SR, 104
5-azacytidin, 117
5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktozid, 34
5-metylcytozin, 67
absorbance, 10
acetylace histonů, 117
acetyltransferázy histonové, 117
adaptor, 30
adenozin 5'-fosfosulfát, 68
AFLP viz polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů
agaróza, 13
ALFA viz analýza fluorescenční laserová automatická
alfa-komplementace, 34, 38
alkalická fosfatáza, 18
amplifikace alelově specifická, 89
amplifikace DNA vytěsňováním řetězce, 104
amplifikace konců cDNA rychlá, 91
amplifikace mezerníků vnitřních přepisovaných, 98
amplifikace mezi jednoduchými repetitivními sekvencemi, 101
amplifikace mikrosatelitních polymorfních lokusů selektivní, 104
amplifikace nukleových kyselin za nepřítomnosti termofilní DNA-polymerázy, 104
amplifikace otáčivou kružnicí, 108
amplifikace polymorfní DNA náhodná, 99
amplifikace replikázou Q β , 106
amplifikace restričních fragmentů selektivní, 102
amplifikace sondy, 106
amplifikace úseku DNA, 75
amplifikace vzácných restričních míst, 102
amplifikační reakce s jedním primerem, 101
amplifikační systém transkripční, 104
amplikon, 75
analýza fluorescenční laserová automatická, 101
analýza fragmentů RNA štěpených RNázou T1, 153
analýza gelová zpomalovací, 14, 135
analýza konformačního polymorfizmu jednořetězců, 57, 156
analýza otisku RNázaT1-oligonukleotidů, 152
analýza pohyblivosti heteroduplexů, 58, 157
analýza polymorfizmu délky segmentů genomu, 152
analýza reprezentativních rozdílů, 129
analýza restriční endonukleázová, 55
analýza retardační, 14
APEX, 69
AP-PCR viz reakce polymerázová řetězová náhodná
APS, 68
apyráza, 68
ARMS viz mutační systém amplifikaci nedostupný
ASA viz amplifikace alelově specifická
ASO viz oligonukleotidy alelově-specifické
AS-PCR viz reakce polymerázová řetězová alelově specifická
AS-PE, 69
Aspergillus oryzae, 153
ATP sulfuryláza, 68
avidin, 23
BAC viz umělý bakteriální chromozom
bakteriofág lambda, 36
bakteriofág Q β , 106
banka genomová, 41
banka genová, 41
barviva fenantridinová, 10
barviva kyaninová fluorescenční, 80
betain, 79
bezchybnost syntézy DNA, 78
bioinformace, 162

- bioinformatika, 161
 biotin, 23, 155
 BLAST, 167
 BLOSUM, 168
 bod tání DNA, 21
 BOX-PCR, 101
 buňky kmenové embryonální, 113
 cDNA, 32
 celuláza, 7
 centrifugace diferenciální, 11
 centrifugace izokinetická, 11
 centrifugace izopyktnická, 12
 centrifugace zonální, 11
 CFLP viz polymorfismus délky
 fragmentů DNA vytvořených
 cleavasou
 CGH viz hybridizace srovnávací
 genomová
 CIB, 162
 cleavasa I, 56
 ClustalW, 169
 COP viz připojení oligonukleotidu
 kompetitivní
 CPT viz technologie sondy cirkulující
 cytometrie průtoková, 146
 čas reorientační, 15
 činidlo chelatační, 75
 čip DNA, 69, 131
 čip EST, 132
 DAF, 99
 databáze DDBJ, 162
 databáze EMBL, 162
 databáze GenBank, 162
 databáze genomová, 162
 databáze InterPro, 171
 databáze MEDLINE, 162
 databáze MMDB, 164
 databáze molekulárně biologické, 162,
 163
 databáze PDB, 163
 databáze Pfam, 171
 databáze PRINTS, 171
 databáze ProDom, 171
 databáze PROSITE, 171
 databáze proteinů sekundární klasifikační,
 170
 databáze SMART, 171
 databáze SWISS-PROT, 163
 databáze TIGRFAMs, 171
 ddF viz dideoxy-fingrprinting
 ddNTP viz 2',3'-
 dideoxyribonukleosidtrifosfát
 DDRT-PCR. viz display diferenciální
 deacetylázy histonové, 117
 DEAE-dextran, 112
 DEIA, 152, 159
 delece přilehlé – vytváření, 66
 denaturace alkalická, 8
 denaturace DNA, 20
 deoxyribonukleáza, 19
 DGGE viz elektroforéza gelová
 denaturační gradientová
 DHFR, 116
 diagnostika molekulární, 54
 diagnostika prostřednictvím PCR, 82
 Dicer, 118
 dideoxy-fingrprinting, 94
 dietylpyrokarbonát, 10
 digoxigenin, 23
 dimetylsulfát, 60
 dimetylsulfoxid, 79, 112
 display diferenciální, 130
 display fágový, 149
 dithiotreitol, 10
 DMSO viz dimetylsulfoxid
 DNA cizorodá, 29
 DNA klonovaná, 29
 DNA metyltransferáza, 116
 DNA-macroarray (DNA-makropole), 132
 DNA-microarray (DNA-mikropole), 69,
 131, 132
 DNA-pol I viz DNA-polymeráza I
 DNA-polymeráza disponující
 3'-exonukleázovou aktivitou, 78
 DNA-polymeráza fága 29, 108
 DNA-polymeráza I, 17
 DNA-polymeráza *Pfu*, 78
 DNA-polymeráza *Pwo*, 78
 DNA-polymeráza *Taq*, 73
 DNA-polymeráza *Tth*, 79, 91
 DNáza I, 19, 135
 DNáza I pankreatická, 66
 DNazym, 118
 DOL, 108
 domény proteinové, 170
 dominantní negativita, 119

- DOP-PCR viz reakce polymerázová
řetězová s degenerovanými
oligonukleotidovými primery
- D-PCR viz reakce polymerázová řetězová
degenerovaná
- DSCP viz polymorfismus konformace
dvouřetězců
- EBI, 162
- EC-PCR, 89
- EDTA, 7
- elektroforéza, 13
- elektroforéza dvourozměrná, 144, 145,
153
- elektroforéza gelová, 13
- elektroforéza gelová denaturační
gradientová, 16
- elektroforéza gelová polyakrylamidová,
140
- elektroforéza gelová pulzní, 14
- elektroforéza horizontální, 13
- elektroforéza kapilární, 13
- elektroforéza vertikální, 13
- elektroporace, 33, 112
- EMSA, 14
- Entrez, 164
- ERIC-PCR, 101
- EST viz místo s expresní adresou
- etidumbromid, 10, 14
- exonukleáza Bal31, 19, 67
- exonukleáza III, 19, 67
- ExpASy, 165
- exprese genová, 116, 121
- exprese heterologní, 29
- extrakt sbalovací, 37
- FACS, 95
- FASTA, 167
- fenotyp Spi⁻, 38
- FERP viz reakce polymerázová řetězová
interrepetitivní fluorescenčně
zdokonalená
- fingerprint DNA, 55
- FISH viz hybridizace fluorescenční *in situ*
- fluorescein, 23, 80
- fluorescence, 79
- fluorofor, 79
- fokusace izoelektrická, 144
- fosfatáza, 17
- FRET viz přenos energie fluorescenční
rezonancí
- G418, 116
- gel agarózový, 13
- gel polyakrylamidový, 13, 16
- gen *cI*, 38
- gen *env*, 159
- gen *gag*, 153
- gen reportéřský, 133
- genom, 121
- geny ortologní, 97
- GFP, 133
- gradient CsCl, 13
- gradient diskontinuální, 12
- gradient hustotní, 12
- gradient kontinuální, 12
- gradient sacharózový, 12
- GSLPA viz polymorfismus délky
genomových segmentů
- GTC viz guanidin thiokyanát
- guanidin thiokyanát, 152
- HAT, 117
- HDAC, 117
- heteroduplex, 58, 157
- HIV, 152, 157
- HMA viz analýza pohyblivosti
heteroduplexů
- HMM viz modely Markovovy skryté
- hodnota E, 167
- hodnota S, 10
- homoduplex, 58, 157
- HTA, 152, 159
- HTLV-1, 152
- HTLV-2, 152
- hustota vznášivá, 12
- hybridizace, 34
- hybridizace fluorescenční *in situ*, 27
- hybridizace *in situ*, 27, 97, 126
- hybridizace kolonií, 25
- hybridizace nukleových kyselin, 20
- hybridizace plak, 25
- hybridizace restričních fragmentů
selektivní, 55
- hybridizace srovnávací genomová, 95
- hybridizace subtraktivní, 128
- hybridizace tečková (kapková), 25
- hybridizace zpětná (reverzní), 25, 152
- hybridizační podmínky málo přísné, 25
- hybridizační podmínky přísné, 25
- hydrazin, 60
- hygromycin B, 116

- chiméra proteinová, 38
 chlorid cesný, 12
 chlorid litný, 151
 chromatografie afinitní, 9
 chromatografie gelová, 9
 chromatografie iontoměničová, 9, 145
 chromatografie sloupcová, 145
 identifikace DNA, 54
 imunoprecipitace, 142
 inaktivace genu *cI*, 38
 inaktivace inzerční, 34
 inaktivace produktu PCR, 77
 inhibitor syntézy DNA koncový, 62
 interkalace, 10
 internet, 161
 inzert, 29
 inženýrství genové, 29
 IPCR viz reakce polymerázová řetězová
 obrácená
 IPTG viz izopropyl- β -D-tiogalaktosid
 IRS-PCR viz amplifikace vzácných
 restrikčních míst
 ISH viz hybridizace *in situ*
 ISSR viz amplifikace mezi jednoduchými
 repetitivními sekvencemi
 ISTR viz repete inverzní sekvence
 značené
 ITS-PCR viz reakce polymerázová
 řetězová vnitřních prepisovaných
 mezerníků
 izopropyl- β -D-tiogalaktosid, 34
 izoschizomer, 19
 jednotka Svedbergova, 11
 kapacita klonovací, 36
 kináza, 17
 Klenowův enzym, 17
 Klenowův fragment DNA-pol I, 17
 klon DNA, 29
 klon molekulární, 29
 klonování DNA, 29
 klonování genů, 29
 klonování molekulární, 29
 klony přeskokovací, 44
 klony spojující, 50
 knihovna cDNA, 41
 knihovna genomová, 41, 54
 knihovna genová, 41
 knihovna genová expresní, 41
 knihovna pro přeskokování, 44
 knihovna spojujících klonů, 50
 koeficient sedimentační, 10, 11
 konec kohezní, 30
 konec lepivý, 30
 konec primeru lepivý, 89
 kontaminace DNA při PCR, 76
 kontig, 48, 50, 66
 kontroly při PCR, 76
 kosmid, 38
 kyselina hydroxamová, 117
 kyselina katalytická nukleová, 118
 kyselina mykofenolová, 116
 laurylsíran sodný, 7, 141
 LCR viz reakce ligázová řetězová
 LDR viz reakce ligázová detekční
 ligáza, 17, 107
 lipozom, 112
 luciferáza, 23, 68, 133
 luciferin, 68
 lysozym, 7
 lyze buněk, 7
 MAAP, 99
 majáky molekulární, 82
 MALDI, 161
 mapa fyzikální, 45
 mapa kontigová, 50
 mapa makrorestrikční, 47, 48
 mapa restrikční, 45
 mapování kontigové, 48
 mapování restrikční, 45
 marker selekční, 33
 matice substituční aminokyselinová, 168
 matice tečková, 169
 MB viz majáky molekulární
 metotrexát, 116
 metylace DNA, 67, 116
 metyláza, 17
 mikročipy proteinové, 146
 mikroinjekce, 113
 mikrosatelit, 52, 56, 99
 minisatelit, 52, 56
 minisekvencování, 69
 místo mnohočetné klonovací, 33
 místo restrikční, 19
 místo s expresní adresou, 52
 místo se sekvenční adresou, 52
 místo štěpení, 19
 místo vazebné pro ribozóm, 170
 modely Markovovy, 170

- modely Markovovy skryté, 170
 modifikace konců DNA, 89
 molekula DNA rekombinantní, 29
 mutační systém amplifikaci nedostupný, 89
 NASBA, 104
 NCBI, 162
 NIG, 162
 NLM, 162
 NMR, 161
 nukleáza, 17
 nukleáza S1, 19
 nukleová kyselina protismyslná, 117
 OLA viz stanovení ligační oligonukleotidové
 oligonukleotidy alelově-specifické, 76
 oligonukleotidy návnadové („decoy“), 118
 oligonukleotidy protismyslné, 117
 organismus transgenní, 29
 otisk DNA, 55
 PAC viz umělý chromozom odvozený z bakteriofága P1
 PAM, 168
 PAMSA, 90
 panel radiačních hybridů, 54
 PASA viz amplifikace alelově specifická
 PCR viz reakce polymerázová řetězová
 PCR-EIA, 76
 PCR-ELISA, 76
 PCR-ISH viz reakce polymerázová řetězová *in situ*
 PCR-OLA, 108
 PCR-RFLP viz polymorfismus délky restričních fragmentů u produktů PCR
 PCR-ribotypizace, 99
 PCR-SSCP, 57, 152
 peptidová nukleová kyselina, 24
 peroxidáza, 23
 PFGE viz elektroforéza gelová pulzní
 piperidin, 60
 plazmid pBR322, 34
 plazmid Ti, 115
 PMSF viz fenylmetylsulfonylfluorid
 PNA viz peptidová nukleová kyselina
 pohyblivost elektroforetická, 14
 pohyblivost heteroduplexů, 58
 polyakrylamid, 13
 polylinker, 33
 polymeráza, 17
 polymorfismus amplifikační sekvenčně specifický, 104
 polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů, 56, 102
 polymorfismus délky fragmentů DNA s jednoduchou repeticí, 56
 polymorfismus délky fragmentů DNA vytvořených cleavasou, 56
 polymorfismus délky genomových segmentů, 159
 polymorfismus délky jednoduchých repetitivních sekvencí, 99
 polymorfismus délky restričních fragmentů, 55
 polymorfismus délky restričních fragmentů u produktů PCR, 85
 polymorfismus konformace dvouřetězců, 57
 polymorfismus konformace jednořetězců, 57
 polymorfizmy genomů, 54
 polymorfizmy jednonukleotidové, 69
 polymorfizmy konformační, 55
 posun jednořetězcového zlomu, 23
 primer alelově specifický, 90
 primer AmpliFluor, 82
 primer LUX, 82
 primer oligo(dT), 91
 primer pro AFLP, 102
 primer pro ligázovou řetězovou reakci, 107
 primer pro PCR, 73
 primer pro sekvencování, 61
 primer SDA, 105
 primery degenerované, 96
 primery degenerované oligonukleotidové, 95
 primery navrhování, 74
 primery sekvenační univerzální, 62
 primery vnější, 87
 primery vnitřní, 87, 159
 PRINS viz značení *in situ* zprostředkované primerem
 prodlužování primeru, 23
 produkt PCR, 75
 procházení po chromozomu, 42
 procházení primerem, 66

- promotor SP6, 104, 155
 promotor T7, 104, 155
 pronáza E, 8
 proteáza, 8
 proteináza K, 8
 proteom, 121
 protilátka/antigen, 142
 protilátky monoklonální, 137
 protilátky polyklonální, 137
 přenos energie fluorescenční rezonancí, 80
 přenos northernový, 26, 121
 přenos po elektroforetické separaci, 26
 přenos Southernův, 26, 152
 přenos westernový, 26, 140
 přeskokování po chromozomu, 44
 připojení oligonukleotidu kompetitivní, 89
 psoralen, 77
 puromycin, 116
Pyrococcus furiosus, 78
Pyrococcus woesei, 78
 pyrosekvencování, 67
 QBR viz amplifikace replikázou Q β
 QC-PCR viz reakce polymerázová řetězová s kvantitativně kompetitivním stanovením
 QPCR viz reakce polymerázová řetězová kvantitativní
 RACE viz amplifikace konců cDNA rychlá
 RAPD viz amplifikace polymorfní DNA náhodná
 RBS viz místo vazebné pro ribozóm
 RCA viz amplifikace otáčivou kružnicí
 RDA viz analýza reprezentativních rozdílů
 REA viz analýza restriční endonukleázová
 reakce ligázová detekční, 108
 reakce ligázová řetězová, 107
 reakce polymerázová řetězová, 24, 73
 reakce polymerázová řetězová alelově specifická, 89
 reakce polymerázová řetězová Alu-sekvencí, 101
 reakce polymerázová řetězová asymetrická, 64, 94
 reakce polymerázová řetězová degenerovaná, 96
 reakce polymerázová řetězová "hot-start", 76
 reakce polymerázová řetězová *in situ*, 97
 reakce polymerázová řetězová interrepetitivní fluorescenčně zdokonalená, 101
 reakce polymerázová řetězová inverzní, 88
 reakce polymerázová řetězová kolonií, 88
 reakce polymerázová řetězová kvantitativní, 79
 reakce polymerázová řetězová mnohonásobná, 85
 reakce polymerázová řetězová náhodná, 99
 reakce polymerázová řetězová obrácená, 88
 reakce polymerázová řetězová odstupňovaná, 87
 reakce polymerázová řetězová pro amplifikaci dlouhých úseků DNA, 78
 reakce polymerázová řetězová repetitivní, 100
 reakce polymerázová řetězová s degenerovanými oligonukleotidovými primery, 95
 reakce polymerázová řetězová s kvantitativně kompetitivním stanovením, 79
 reakce polymerázová řetězová vnitřních ribozomálních mezerníků, 99
 reakce polymerázová řetězová zpětná, 90, 124
 rehybridizace, 27
 renaturace DNA, 20
 reorientace, 15
 repetice Alu, 101
 repetice inverzní sekvenčně značené, 101
 repetice tandemové, 99
 replikáza Q β , 106
 REP-PCR viz reakce polymerázová řetězová repetitivní
 restriční endonukleázy, 19
 restriční fragment, 19
 retroviry, 113
 RFLP viz polymorfismus délky restričních fragmentů

- ribonukleáza, 7, 19
 ribotypizace, 56
 ribozym, 118
 RISC, 118
 RNA interference, 118
 RNA-polymeráza, 123
 RNáza, 19
 RNáza H, 104, 108
 RNáza III, 106
 rodamin, 23
 rozpoznávací (cílové) místo, 19
 roztok gradientní, 11
 RPA viz test ochrany před účinkem RNázy A
 RS-PCR viz PCR-ribotypizace, viz reakce polymerázová řetězová vnitřních ribozomálních mezerníků
 RT-PCR viz reakce polymerázová řetězová zpětná
 RT-PCR v reálném čase, 124
 RT-PCR-RFLP, 152
 rychlost úhlová, 11
 sacharóza, 12
 SAMPL viz amplifikace mikrosatelitních polymorfních lokusů selektivní
 SBH viz sekvencování pomocí hybridizace
 SDA viz amplifikace DNA vytěsňováním řetězce
 SDS-PAGE, 141
 sekvence Alu, 101
 sekvence aminokyselinová, 59
 sekvence DNA, 59
 sekvence jednoduchá repetitivní, 99
 sekvencování + / -, 61
 sekvencování celogenomové, 52, 66
 sekvencování DNA, 16, 59
 sekvencování DNA automatické, 63
 sekvencování enzymové, 61
 sekvencování genomu, 66
 sekvencování genomu virů, 153
 sekvencování hydrogensířičitanové genomové, 67
 sekvencování chemické, 59
 sekvencování Maxamovo–Gilbertovo, 59
 sekvencování náhodné, 66
 sekvencování pomocí hybridizace, 69
 sekvencování Sangerovo, 61
 sekvencování uspořádané, 66
 Sequenase, 62
 seřazení sekvencí celkové, 167
 seřazení sekvencí lokální, 167
 seřazení sekvencí mnohonásobné, 169
 siRNA, 118
 skóre seřazení sekvencí, 167
 skřínink diferenciální, 127
 skřínink dvouhybridní, 148
 SNP viz polymorfizmy jednonukleotidové sonda cirkulující, 108
 sonda hybridizační, 22
 sonda pro vyhledání produktů hledaných genů, 42
 sonda pro vyhledání sekvencí DNA, 42
 sonda Scorpion, 82
 sonda TaqMan, 80
 sondy jednolokusové, 56
 sondy mnoholokusové, 56
 SPAR viz amplifikační reakce s jedním primerem
 specifita relaxovaná (uvolněná), 20
 spektrometrie hmotnostní, 145
 spermidin, 79
 spin column, 9
 spojka (linker), 30
 SRFA viz amplifikace restrikčních fragmentů selektivní
 SRFH viz hybridizace restrikčních fragmentů selektivní
 SRS, 164
 SSAP viz polymorfizmus amplifikační sekvencně specifický
 SSCP viz analýza konformačního polymorfizmu jednořetězců, viz polymorfizmus délky fragmentů DNA vytvořených cleavasou, viz polymorfizmus konformace jednořetězců
 SSLP viz polymorfizmus délky fragmentů DNA s jednoduchou repeticí
 SSR viz sekvence jednoduchá repetitivní standard hmotnostní, 14
 standard velikosti, 14
 stanovení ligační oligonukleotidové, 108
 stanovení sekvence DNA nepřímé, 69
 stanovení sekvence DNA přímé, 69
 STR viz mikrosatelit
 streptavidin, 23, 155
 STS viz místo se sekvenční adresou

- Svedberg, 11
 SYBR, 14
 SYBR[®] Green, 80
 systém kvasinkový dvouhybridní, 148
 T4-DNA-ligáza, 18
 T4-polynukleotidkináza, 18
 TAS viz amplifikační systém transkripční
 technologie sondy cirkulující, 108
 teplota pro připojení (hybridizaci)
 primerů, 75
 teplota T_a , 75
 teplota T_m , 75
 terminální
 deoxyribonukleotidyltransferáza, 18
 terminátory značené barevně, 64
 termocykler, 74
 test jednohybridní, 134
 test ochrany před účinkem RNázy, 122
 test ochrany před účinkem RNázy A, 152,
 155
 test prodloužení primeru, 126
Thermus aquaticus, 73, 107
Thermus thermophilus, 79
 TK, 115
 TMA, 104
 transfekce, 111
 transformace, 33
 transgen, 113
 transkriptom, 121
 trichostatin A, 117
 tymidinkináza, 115
 typizace binární, 99
 typizace DNA, 54
 umělý bakteriální chromozom, 39
 umělý chromozom odvozený
 z bakteriofága P1, 39
 umělý kvasinkový chromozom, 39
 uracil-N-glykosyláza, 77
 vazba primerů, 74
 vazba primerů nespecifická, 75
 vektor expresní, 36
 vektor inzerční, 36
 vektor klonovací, 29, 32
 vektor kyvadlový, 36
 vektor odvozený z bakteriofága lambda,
 36
 vektor odvozený z bakteriofága M13, 38
 vektor plazmidový, 32
 vektor rekombinantní, 32
 vektor substituční, 36
 vyhledávání genů, 42, 170
 vyhledávání v databázích, 163
 X-gal, 34
 YAC viz umělý kvasinkový chromozom
 zebularin, 117
 zhášeč, 79
 značení *in situ* zprostředkované
 primerem, 98
 značení sond, 22, 23
 značení transkripce *in vitro*, 24
 zpětná transkriptáza, 18
 zpětná transkriptáza viru AMV, 90
 zpětná transkriptáza viru M-MuLV, 90
 zrychlení odstředivé, 11