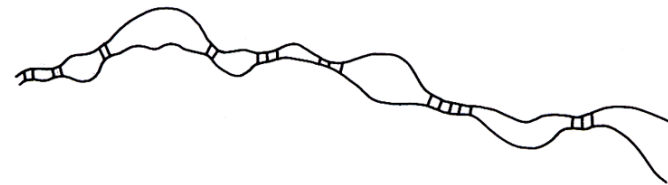


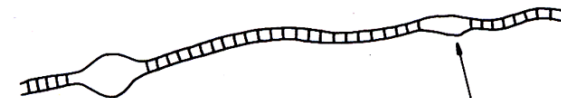
Hybridizace nukleových kyselin

- tvorba dvouřetězcových hybridů ze dvou jednořetězcových a alespoň částečně komplementárních molekul nukleových kyselin
- založena na schopnosti **denaturace a renaturace DNA**
- specifita párování mezi definovanou DNA (sondou) a zkoumaným vzorkem je základem mnoha metod

(a) Nestabilní hybrid

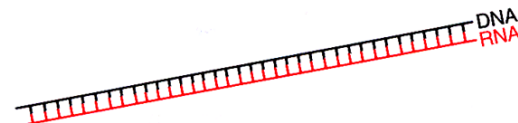


(b) Stabilní hybrid

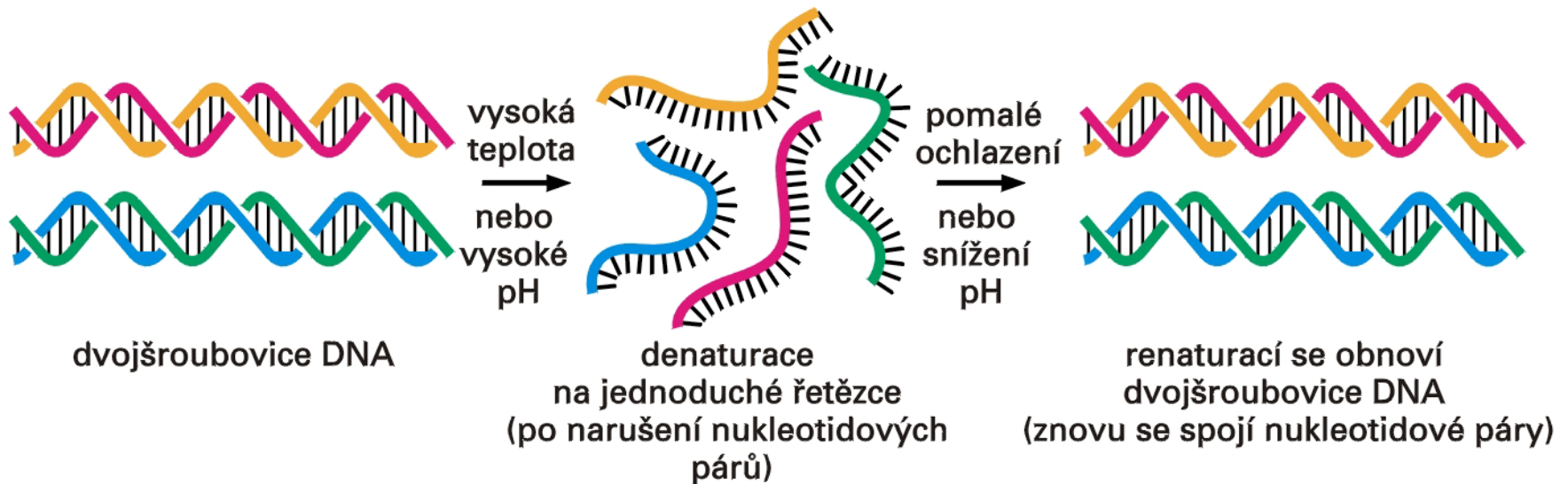


Krátké nekomplementární oblasti neovlivňují celkovou stabilitu

(c) Hybrid DNA-RNA



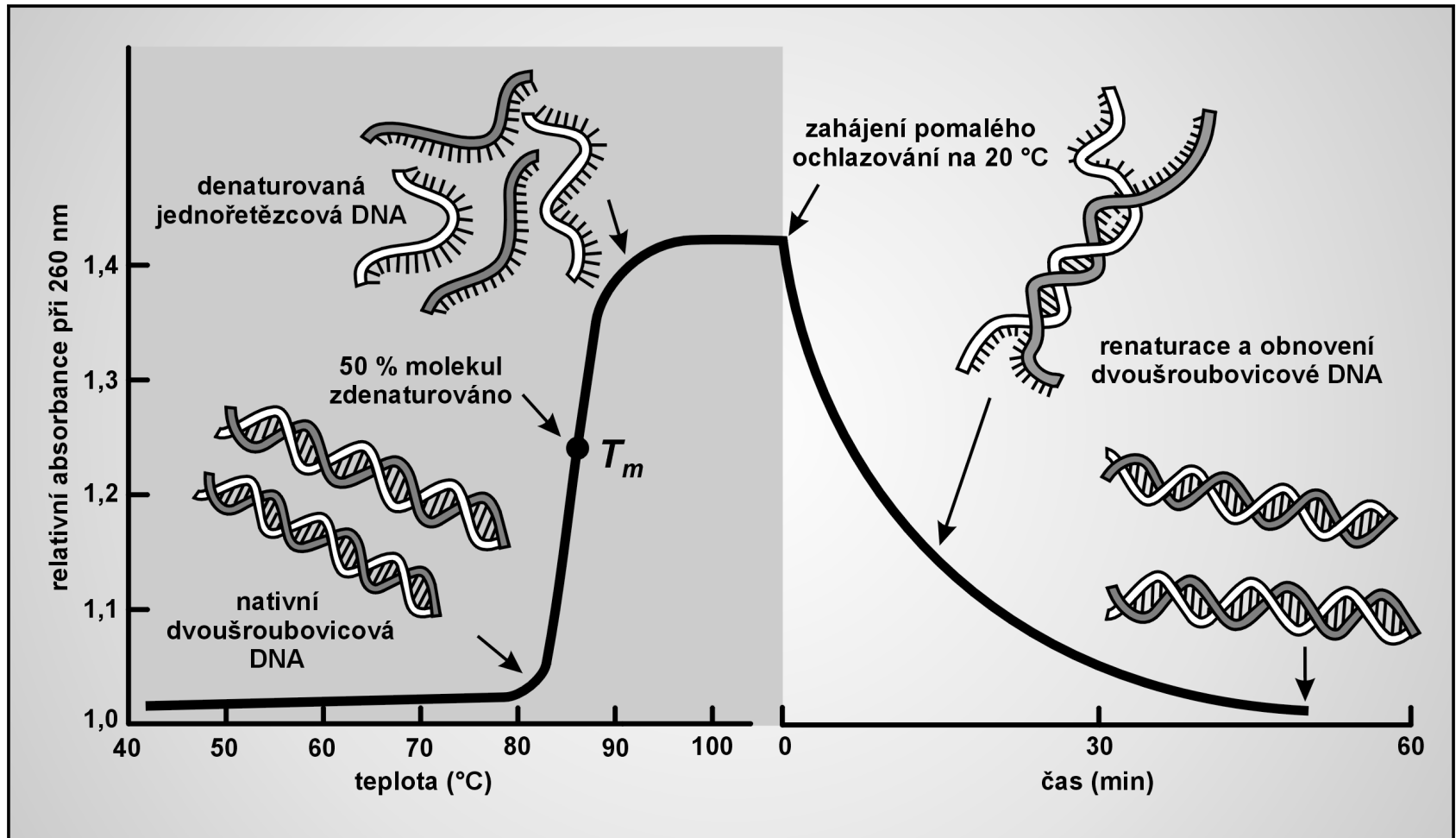
Denaturace a renaturace DNA



© Espero Publishing, s.r.o.

- oddělení plně komplementárních vláken DNA lze dosáhnout např. působením **vysoké teploty** (90-100°C), extrémních hodnot **pH** nebo **denaturačních činidel** (formamid, močovina)
- obnovení běžných podmínek umožňuje pozvolnou renaturaci

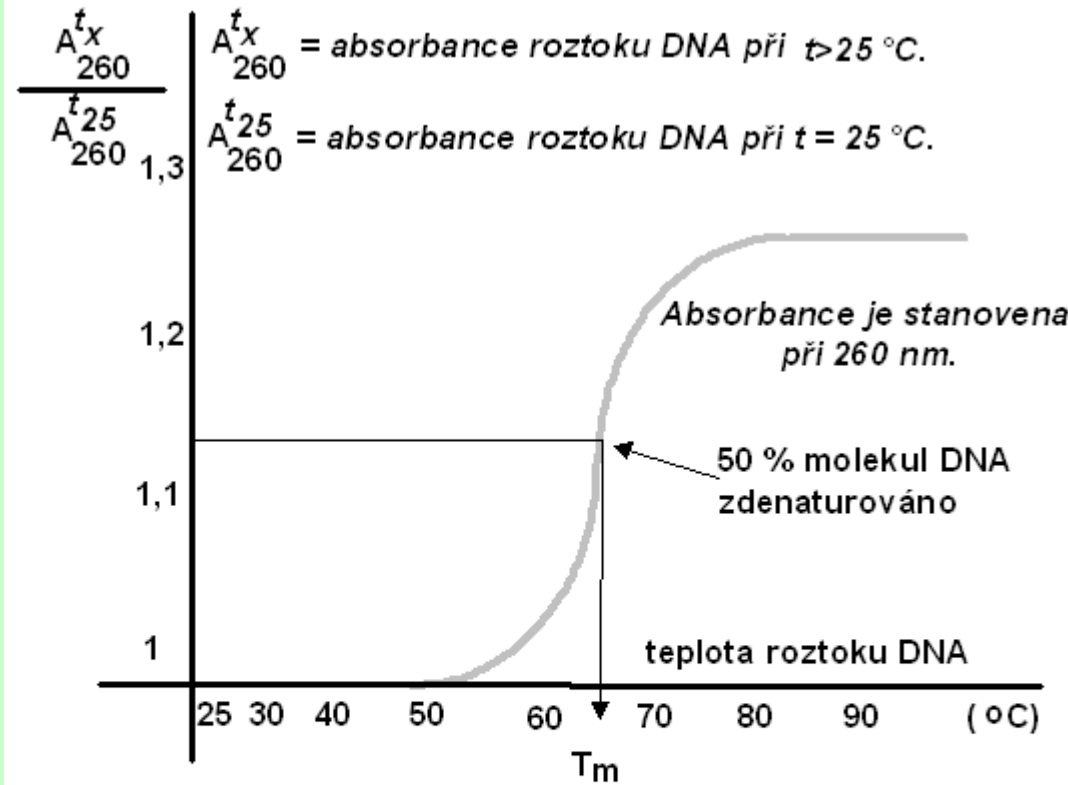
Průběh denaturace i renaturace DNA lze sledovat spektrofotometricky



Stanovení hodnoty T_m

Teplota, při které dochází k denaturaci DNA závisí na obsahu **guaninu a cytozinu** v DNA. **Čím více obsahuje GC-párů, tím vyšší teploty je zapotřebí k její denaturaci.** Rozmezí denaturačních teplot je zhruba 30 - 100 °C. Denuraci DNA provází **hyperchromní efekt**, tj. dochází ke **zvýšení absorbance ultrafialového světla**. Hyperchromní efekt je způsoben rozpadem dvouřetězcových molekul DNA na molekuly jednořetězcové, které absorbují UV-záření silněji než molekuly dvouřetězcové.

Teplota, při níž zdenaturovalo 50 % dvoušroubovicových molekul DNA, se označuje jako **teplota tání** a vyjadřuje se symbolem T_m . Tato teplota odpovídá inflexnímu bodu denaturační křivky.



V definovaném roztoku např. platí, že

$$T_m = 69,3 + 0,41 (GC).$$

Odtud

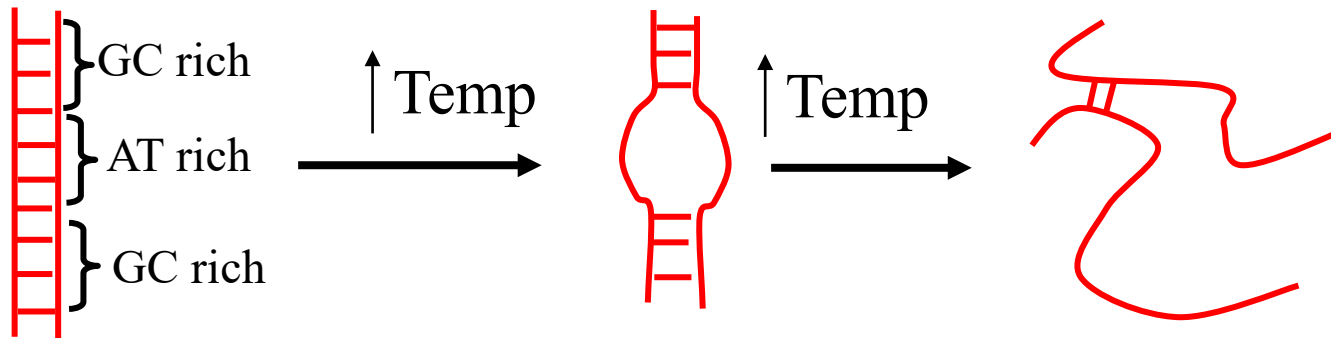
$$GC = \frac{T_m - 69,3}{0,41}.$$

Monitorování teploty tání dsDNA

Teplota tání (denaturace) závisí na čtyřech hlavních faktorech:

- obsahu GC (a AT)
- koncentraci solí
- délce sekvence
- přítomnosti nespárovaných úseků

Vyzkoušejte si hru DNA simulator na : <https://aoti.itch.io/dna-simulator>



Hybridizace molekul nukleových

kyselin. Spojení částečně nebo úplně komplementárních DNA řetězců pocházejících z různých dvouřetězcových molekul DNA nebo podobně spojení DNA-řetězce s RNA řetězcem; oba procesy probíhají *in vivo* a mohou být navozeny *in vitro*.

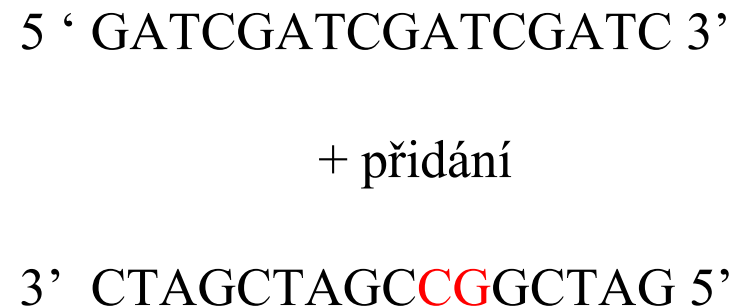
Hybridní molekuly DNA. Renaturované molekuly, v nichž se spojily řetězce pocházející z molekul DNA různých zdrojů.

Homoduplex. Hybridní molekula DNA, jejíž řetězce se vyznačují úplnou komplementaritou.

Heteroduplex. Hybridní molekula DNA, jejíž řetězce se vyznačují neúplnou komplementaritou.



zvýšení teploty



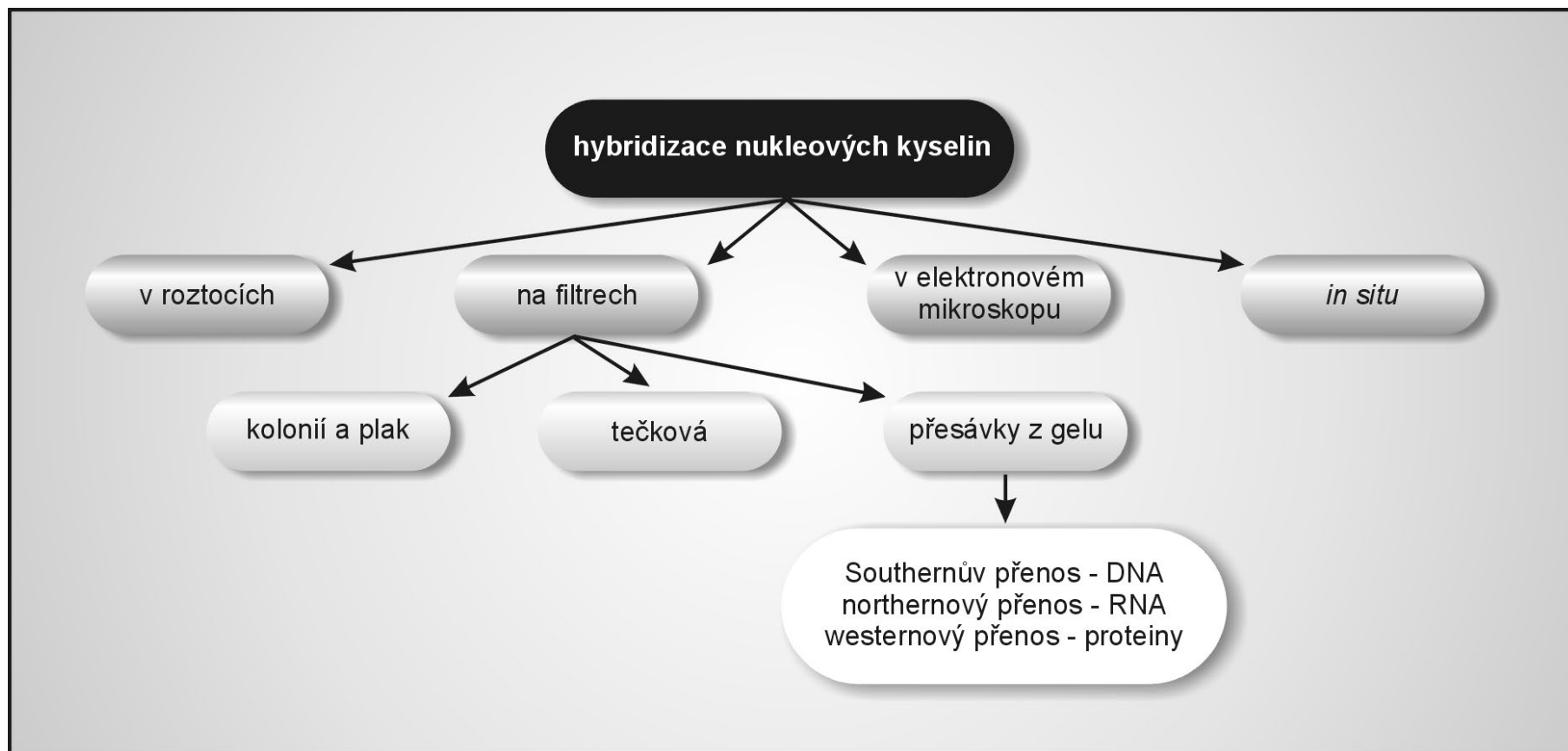
ochlazení



Využití hybridizace nukleových kyselin

- test komplementarity sekvencí (ve směsi mnoha molekul DNA budou hybridizovat jen ty, které jsou dostatečně komplementární) - z toho lze vyvozovat stupeň příbuznosti testovaných organismů
- testy genové exprese (hybridizovat mnohou i molekuly DNA a RNA)
- lokalizace genů na chromozomech (FISH - fluorescence in situ hybridization)
- testy paternity, identifikace osob, atd.
- spojování fragmentů při klonování
- čipové technologie („microarrays“)
- amplifikace nukleových kyselin pomocí PCR (připojení primeru k templátu je rovněž typ hybridizační reakce)
- vyhledávání klonů nesoucích rekombinantní DNA
- Jakékoli další lokalizace podle komplementarity
- Analýza tání DNA (Melting analysis) - testování stability

Různé možnosti uspořádání hybridizačních experimentů



Typy přenosu z gelu na membránu podle typu analyzovaných molekul

- Southernův přenos - DNA
- northernový přenos - RNA
- westernový přenos - proteiny
- southwesternový přenos - proteiny vázající DNA
(sondou je DNA)
- northwesternový přenos - proteiny vázající RNA
(sondou je RNA)

Typický hybridizační experiment - Southernův přenos

- technika vyvinuta E.M. Southernem
- vlastní hybridizaci předchází elektroforéza DNA a přesávka (blotting) na pevnou podložku

Běžné použití:

- detekce přítomnosti určitých genů v buněčné DNA
- sledování evoluční příbuznosti vzorků DNA z různých organismů

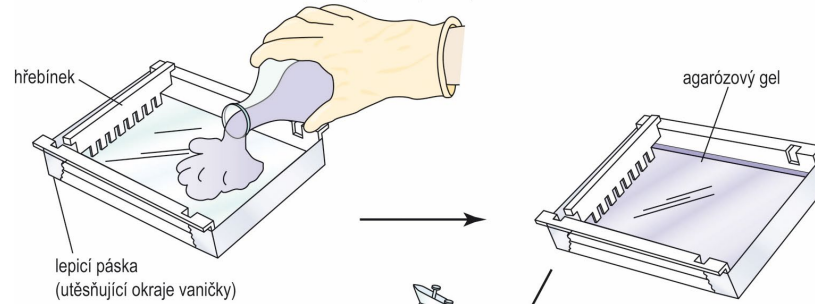
Southernův přenos - postup

- příprava a značení sondy
- rozdělení restričních fragmentů DNA daného vzorku gelovou elektroforézou
- denaturace DNA a přenos jednořetězcových fragmentů DNA na nylonový filtr
- inkubace filtru se značenou jednořetězcovou sondou: hybridizace sondy s komplementární sekvencí imobilizovanou na filtru
- odmytí nenačkané sondy
- detekce navázané sondy - vizualizace hybridů (autoradiografie)

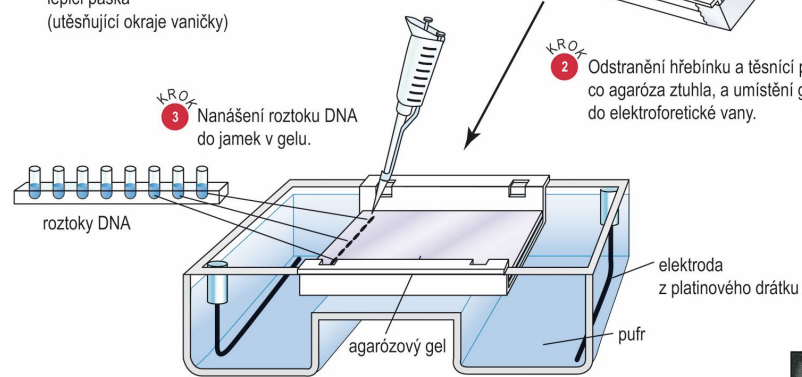
Před přenosem na pevný podklad se provádí elektroforéza

KROK 1 Příprava polotekutého agarózového gelu s jamkami pro vzorky DNA.

nalévání rozvažené agarózy do utěsněné vaničky s hřebínkem umístěným ve správné pozici

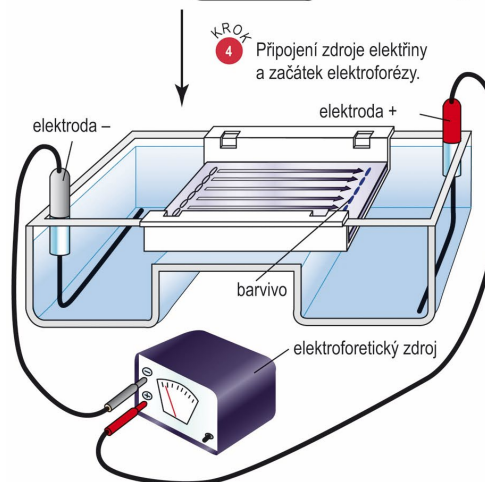


KROK 2 Odstranění hřebínku a těsnící pásky po té, co agaróza ztuhla, a umístění gelu do elektroforetické vany.

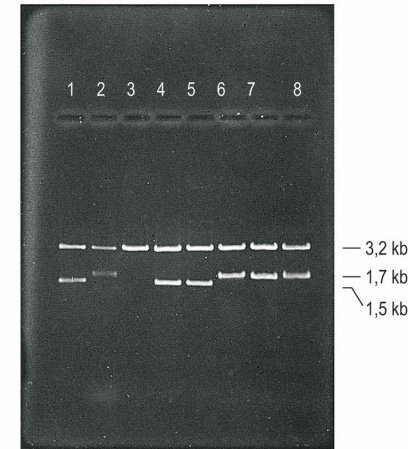


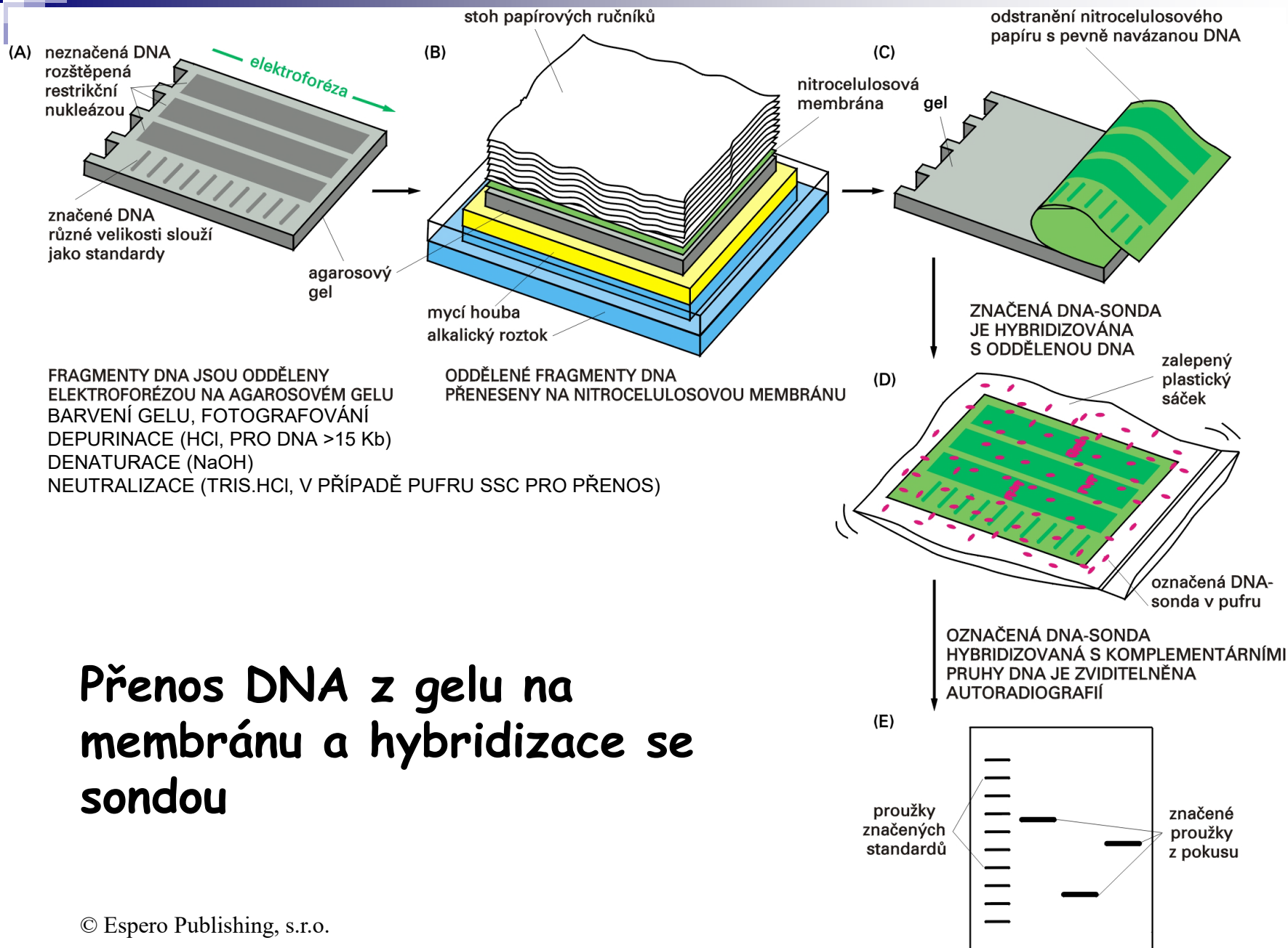
KROK 3 Nanášení roztoku DNA do jamek v gelu.

KROK 4 Připojení zdroje elektřiny a začátek elektroforézy.



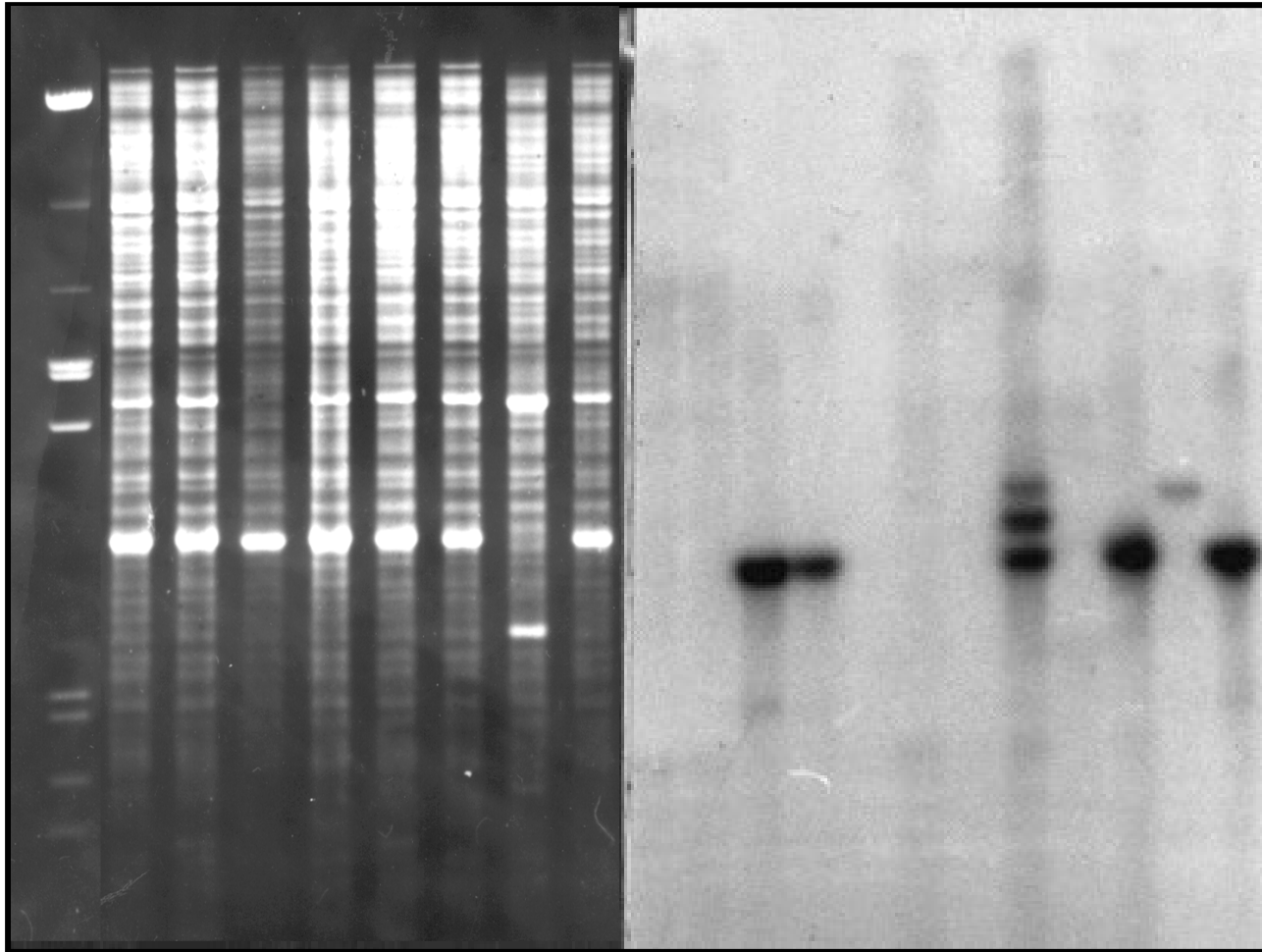
KROK 5 Vyjmutí gelu z vaničky, obarvení etidiumbromidem a vyfotografování v UV světle.





Přenos DNA z gelu na membránu a hybridizace se sondou

Southernův přenos



DNA obarvená
etidium bromidem

autoradiogram

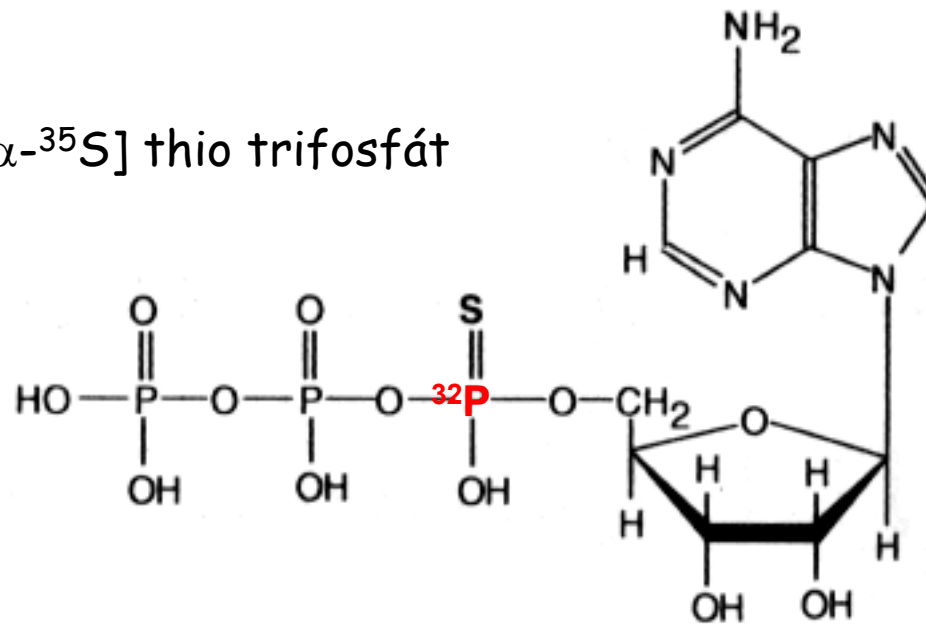
Typy sond

- restrikční fragmenty dvouřetězcové DNA
- produkty PCR
- mRNA izolovaná z buněk nebo tkání
- RNA transkripty *in vitro*
- syntetické oligonukleotidy

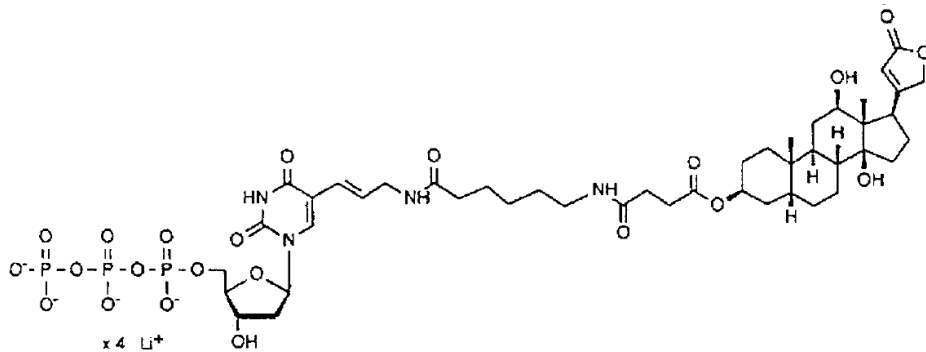
Radioaktivní značení sond

Izotop síry a fosforu lze využít při značení nukleových kyselin

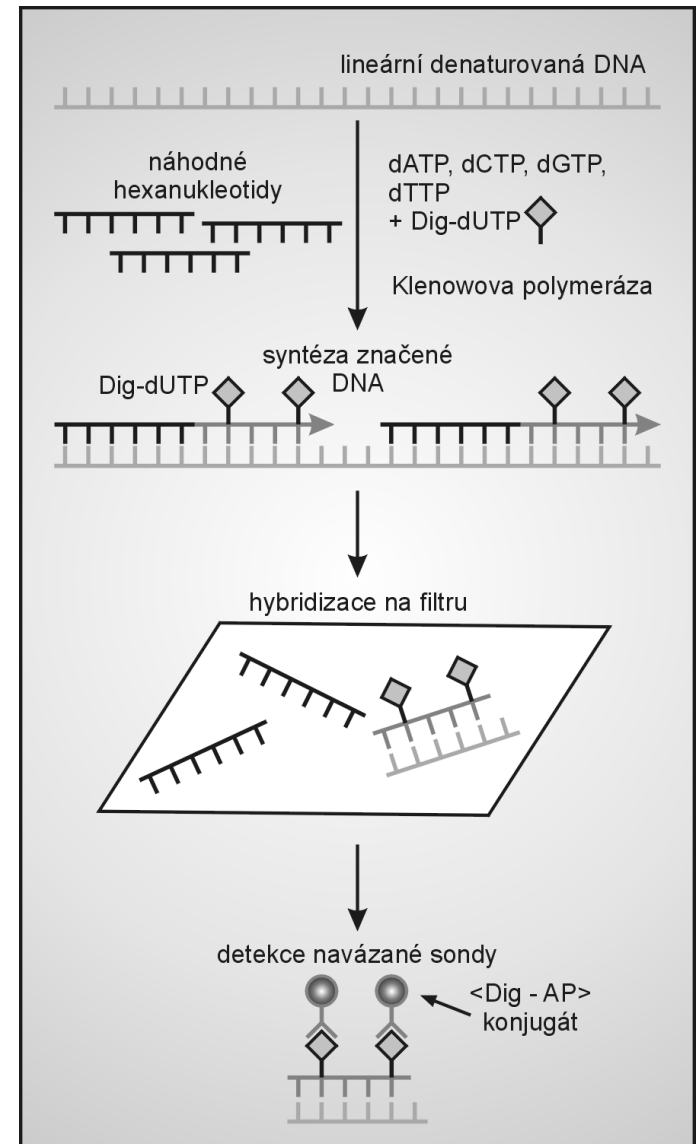
Adenosin 5'-[α - ^{35}S] thio trifosfát



Neradioaktivní značení nukleových kyselin digoxigeninem

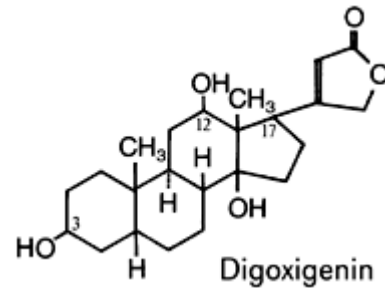


Molekula DIG-dUTP

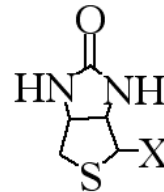


Neradioaktivní značení sond

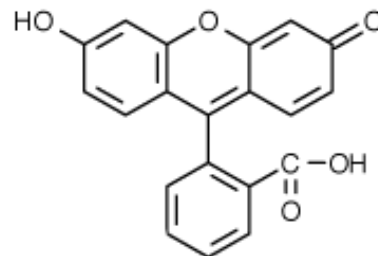
- Digoxineninem



- Biotinem



- fluorescenčními značkami (fluorescein)



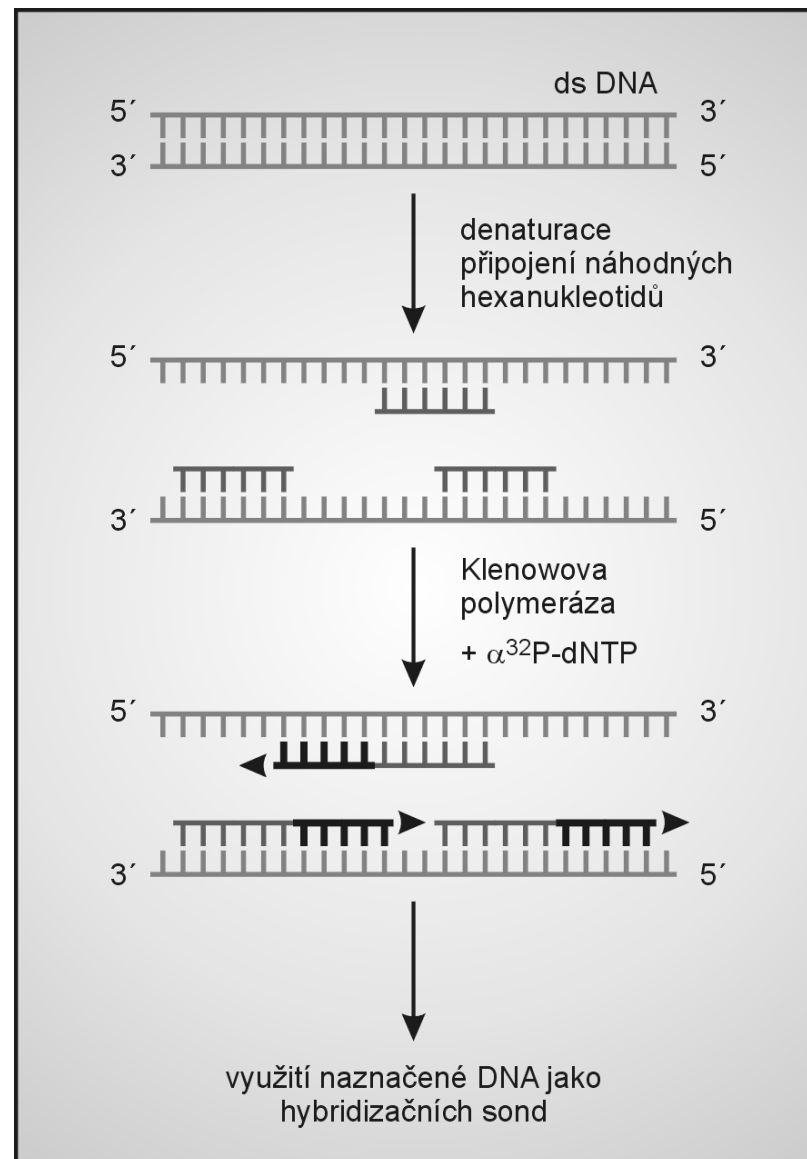
Způsoby značení sond

- prostřednictvím náhodných hexanukleotidů („random primer DNA labeling“)
- posunem jednořetězcového zlomu („nick translation“)
- koncovým značením
- značením vektoru s naklonovanou sondou
- značením transkriptů *in vitro*

Značení DNA pomocí náhodných oligonukleotidů

„Random primer DNA labeling“

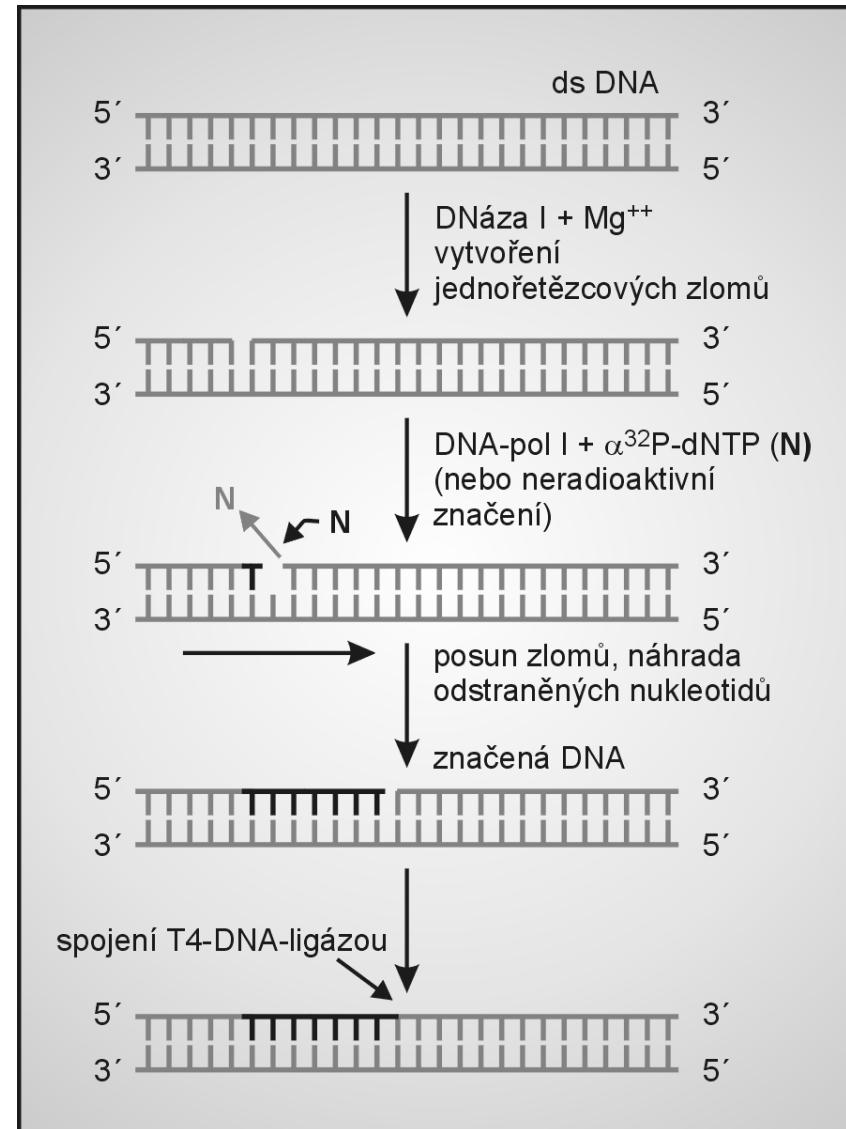
- k ssDNA se přidá směs hexanukleotidů o různých sekvencích
- k těmto primerům připojuje DNA polymeráza značené nukleotidy



Značení DNA posunem jednořetězcového zlomu

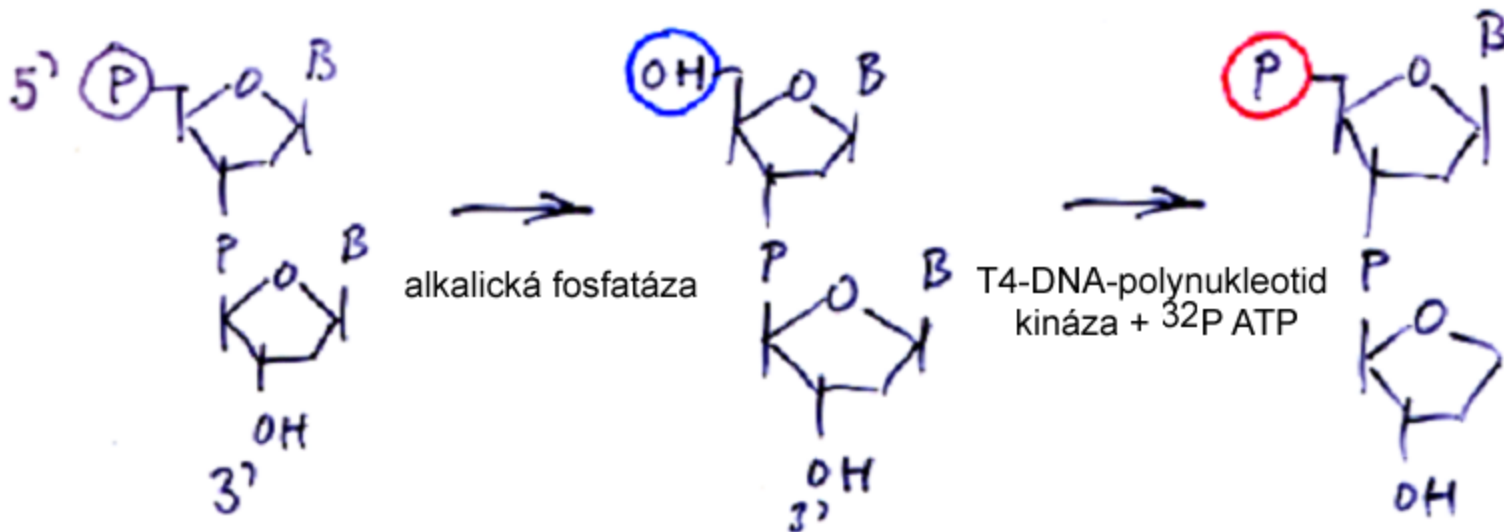
„Nick translation“

- vytvoření náhodných jednořetězcových zlomů DNázou I
- odstranění nukleotidů od místa zlomu DNA polymerázou I (exonukleázová aktivita 5' - 3')
- současné připojení značených nukleotidů k 3' konci zlomu



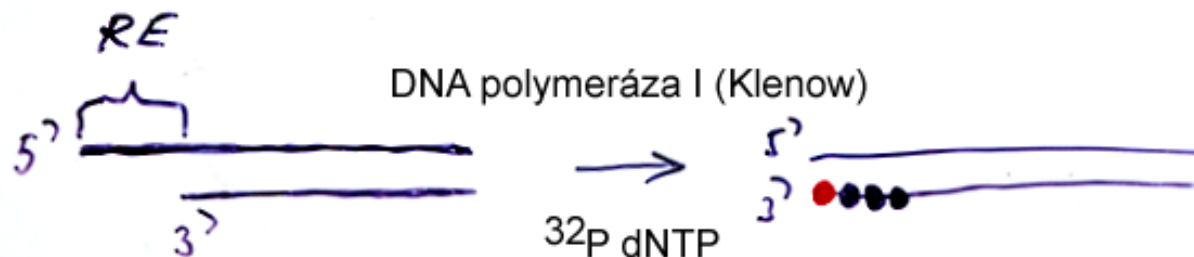
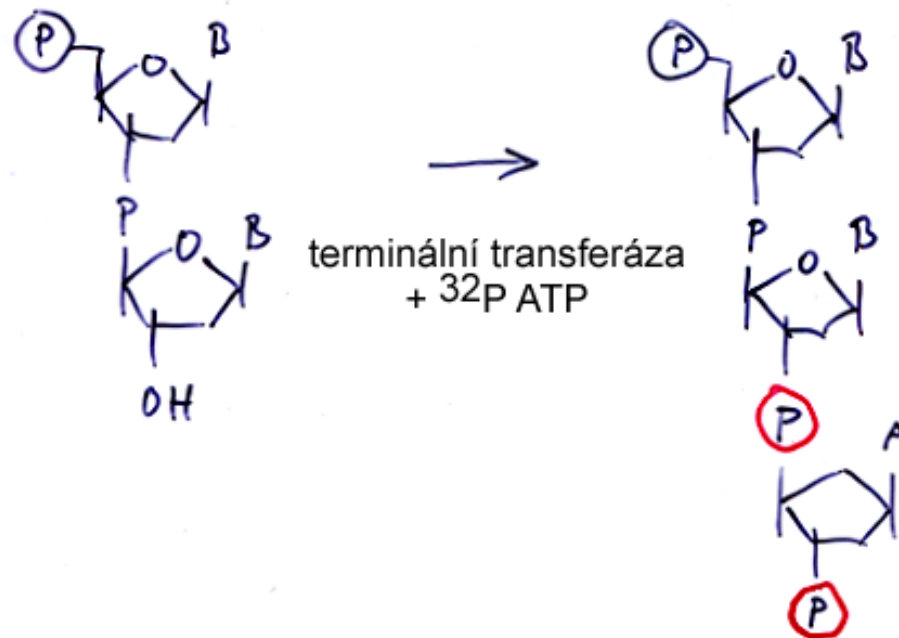
Značení konců fragmentů DNA

a) značení 5' konců



Značení konců DNA fragmentů

b) značení 3' konců



Detekce neradioaktivních značek nukleových kyselin

K značení NK se používá např. biotin-16-dUTP (analog TTP)

Detekce DNA značené bio-dUTP

1. avidin (streptavidin) konjugovaný s **alkalickou fosfatázou**

- chromogenní substrát (X-fosfát + NBT)
- barevná reakce

2. avidin (streptavidin) **konjugovaný s luciferázou**

- substrát (luciferin)
- emise světla - detekce luminometricky

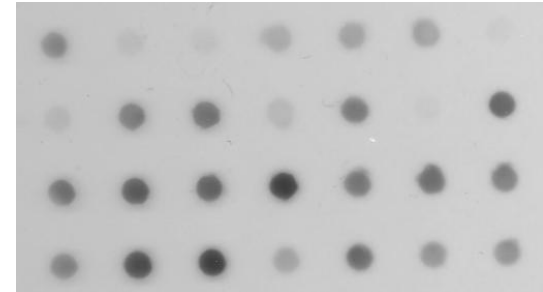
3. avidin (streptavidin) **konjugovaný s křenovou peroxidázou**

- substrát (luminol)
- emise světla - detekce luminometricky

Hybridizační postup

- **Prehybridizace** - zabránění nespecifické vazbě sondy na membránu (Denhardtův roztok, BLOTTO, heparin, heterologní DNA)
- **Hybridizace** - navázání sondy na komplementární sekvence (68°C nebo 42°C s formamidem) - lze volit různé podmínky („stringence“)
- **Promývání** - odstranění nenavázané sondy (účinnost je ovlivněna teplotou, koncentrací solí)
- **Detekce navázané sondy**
 - autoradiografie
 - imunologická reakce - barvení (luminiscence, fluorescence)

Tečková hybridizace („dot blot“)



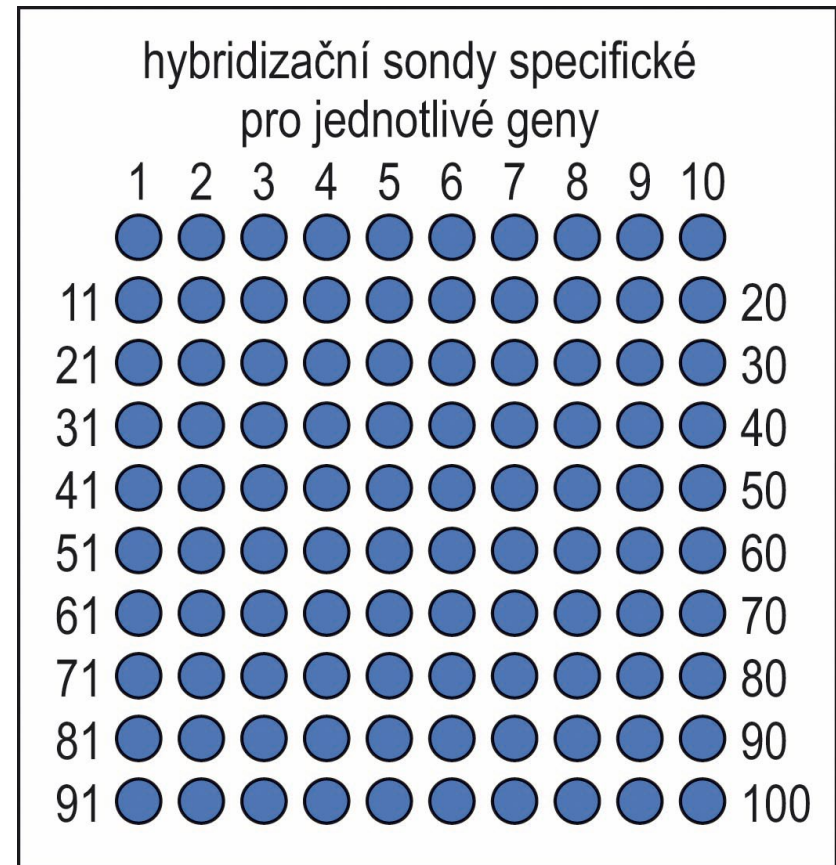
Postup:

- sonikace nebo restrikce genomové DNA; linearizace plazmidové DNA
- denaturace
- nanesení vzorků DNA na podložku v podobě teček
- hybridizace se sondou
- hodnocení hybridizace (vizuálně, denzitometrem, β -spektrometrem)

Tečková hybridizace při analýze genové exprese

Postup:

- hybridizační sondy specifické pro jednotlivé geny se nanesou na membránu pomocí vakuového filtračního přístroje
- membrána se vloží do hybridizačního roztoku obsahujícího molekuly RNA označené radioaktivním izotopem nebo fluorescenčním barvivem
- vizualizace označené RNA navázané na sondy



nylonová membrána nesoucí
matrici 100 sond

Hybridizace *in situ*

- detekce DNA nebo RNA v intaktních buňkách radioaktivními nebo fluorescenčními sondami
- kombinace hybridizace s mikroskopií

Využití:

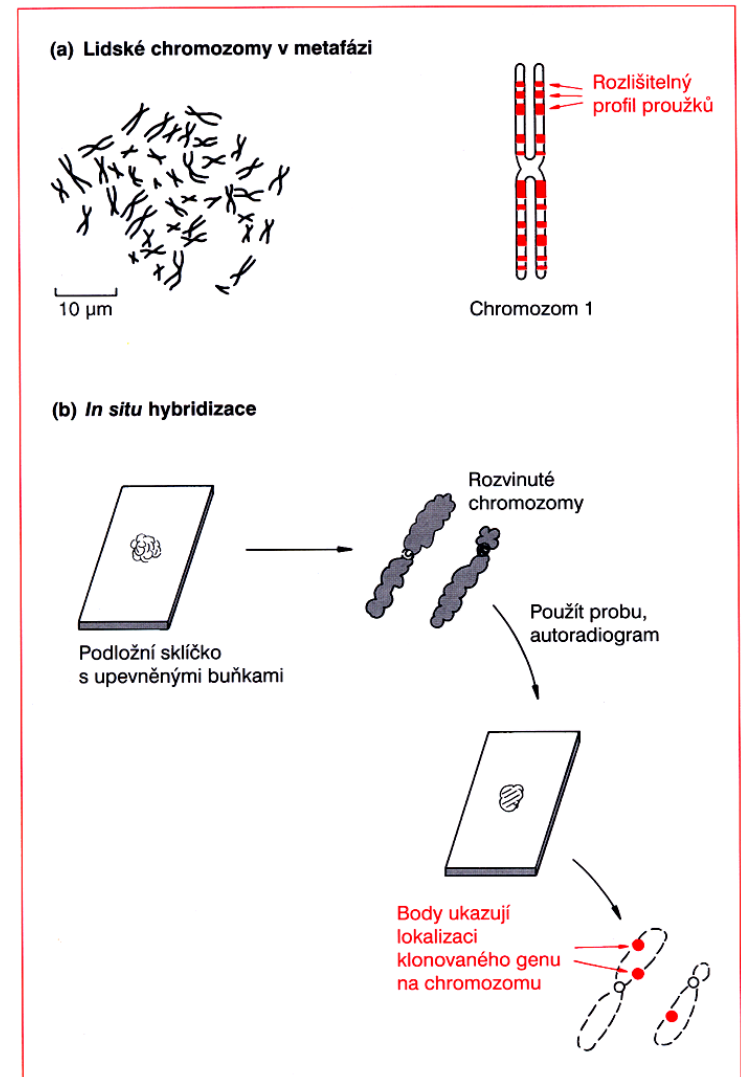
- prostorová lokalizace nukleových kyselin v buňkách a tkáních (hybridizace buněčné RNA)
- lokalizace genů (sekvencí) na chromozomech (hybridizace jaderné DNA)

Obvyklá fluorescenční barviva

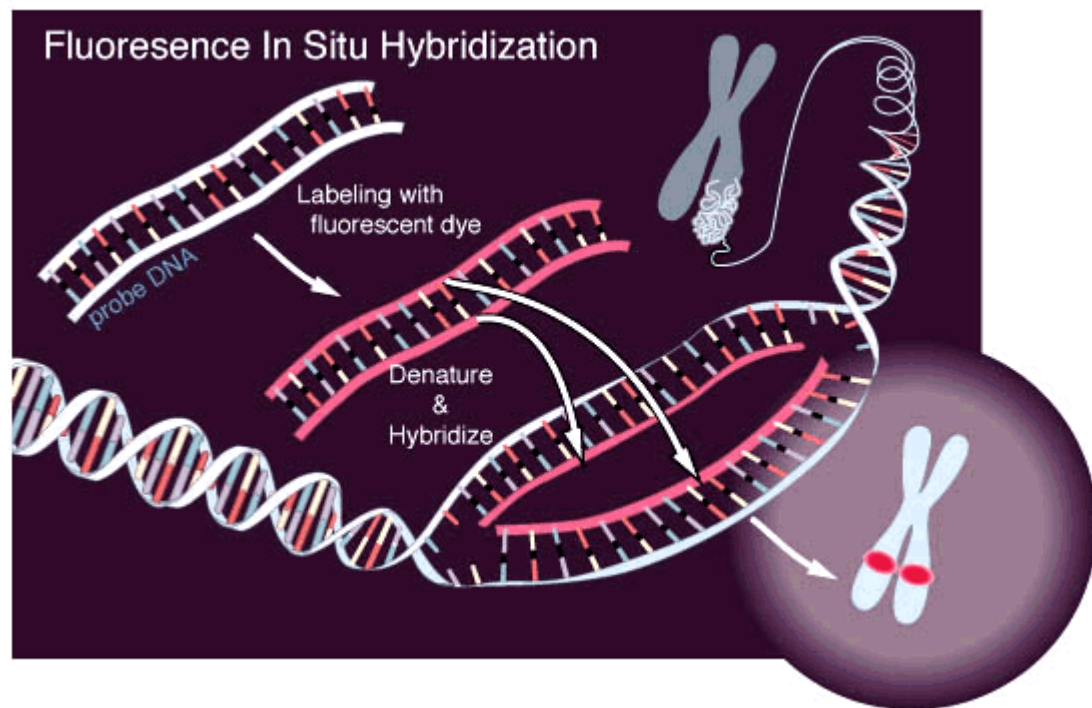
- fluorescein (zelená fluorescence)
- rhodamin (červená fluorescence)
- kumarin (modrá fluorescence)

Postup hybridizace *in situ* při studiu chromozómů

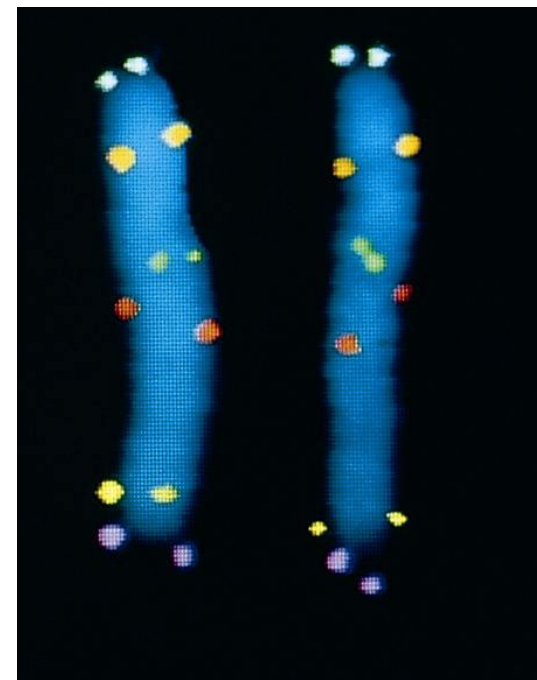
- příprava cytologického preparátu
- fixace objektu na podložním sklíčku
- inkubace za přítomnosti ribonukleázy a NaOH (degradace RNA a denaturace DNA, chromozómy se částečně rozbalí a odhalí tak struktury DNA běžně skryté uvnitř chromozómů)
- hybridizace se značenou sondou
- autoradiografie nebo stanovení fluorescence
- barvení preparátu
- světelná nebo fluorescenční mikroskopie



Použití hybridizace *in situ* pro detekci genů na chromosomech (FISH)



Použito 6 různých sond pro analýzu lidského metafázního chromozomu 5. Každá sonda vytváří 2 tečky na každém chromozomu (v mitóze je DNA zreplikována, tj. chromozom je složen ze dvou chromatid).





Využití hybridizačních technik v praxi

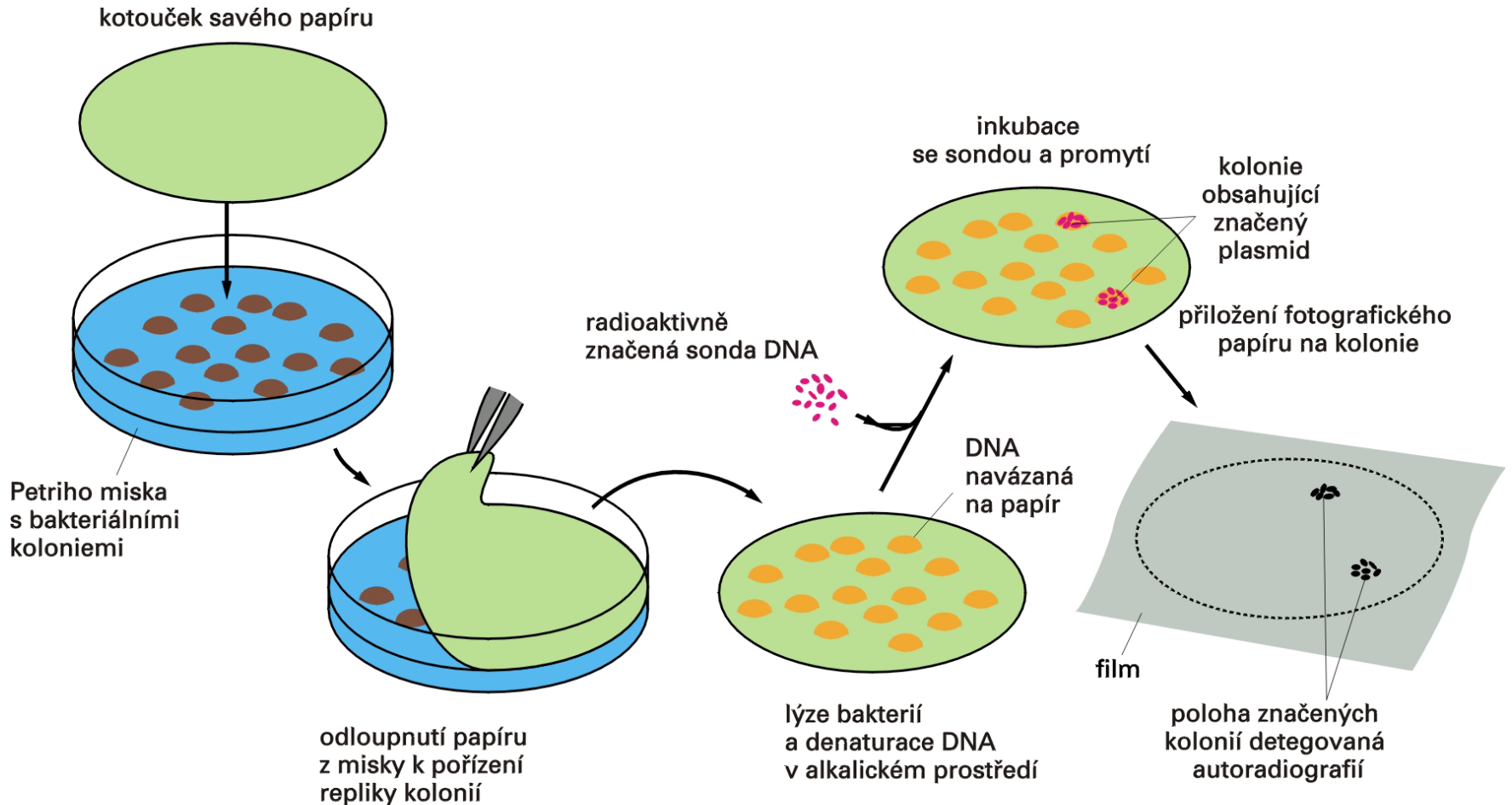
Detekce rekombinantních klonů

- bakteriálních
- fágových

Postup:

- výsev na plotnu (100 - 1000 CFU/PFU)
- růst do přiměřené velikosti kolonií
- přenos na 1 - 2 filtry
- lýze bakterií denaturace DNA
- hybridizace se sondou
- autoradiografie
- vyhledání odpovídajících kolonií (plak) obsahujících hledanou sekvenci DNA

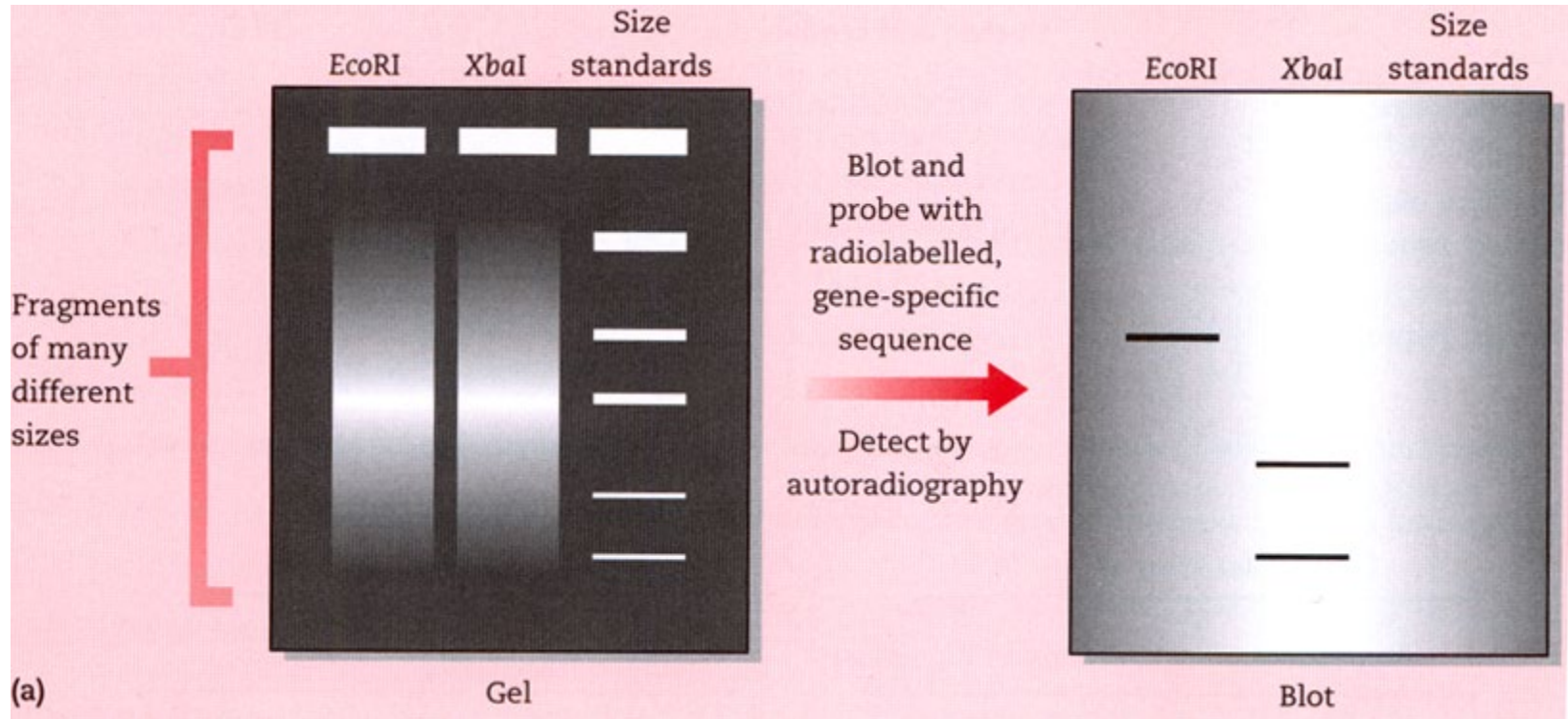
Detekce bakteriálního klonu nesoucího určitý fragment DNA



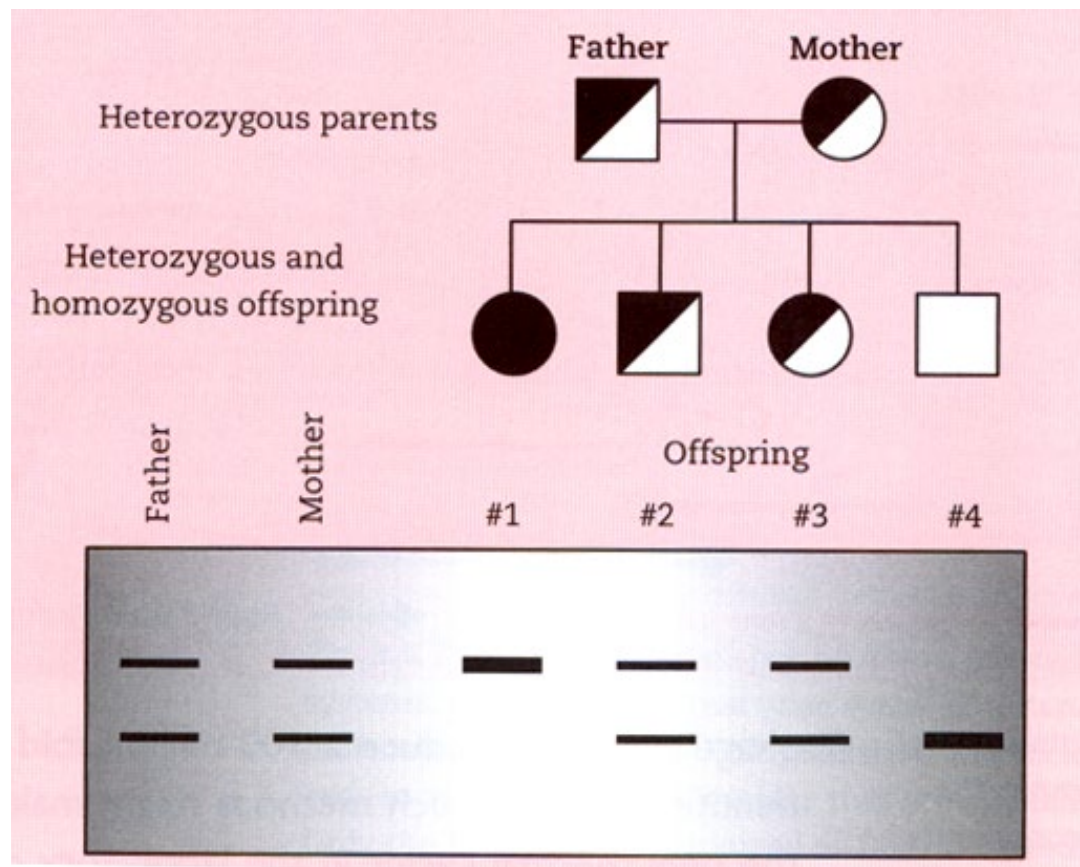
Selektivní hybridizace restrikčních fragmentů (SRFH)

- Základní metodické kroky při SRFH
 - štěpení celkové chromozomální DNA restrikčním enzymem
 - separace fragmentů pomocí elektroforézy
 - přenos fragmentů z gelu na nitrocelulóзовou nebo nylonovou membránu
 - hybridizace DNA navázané na membráně s jednou nebo více značenými sondami homologickými se zkoumanými geny
 - detekce navázané sondy
 - sondy značené radioizotopy + autoradiografie
 - sondy značené neradioaktivně (digoxigenin, biotin, fluorescein, atd.) a následná detekce zahrnující enzym (AP) a barvotvorný substrát nebo enzym a chemiluminiscenční substrát
 - vyhodnocení RFLP

Lokalizace specifických sekvencí v genomové DNA

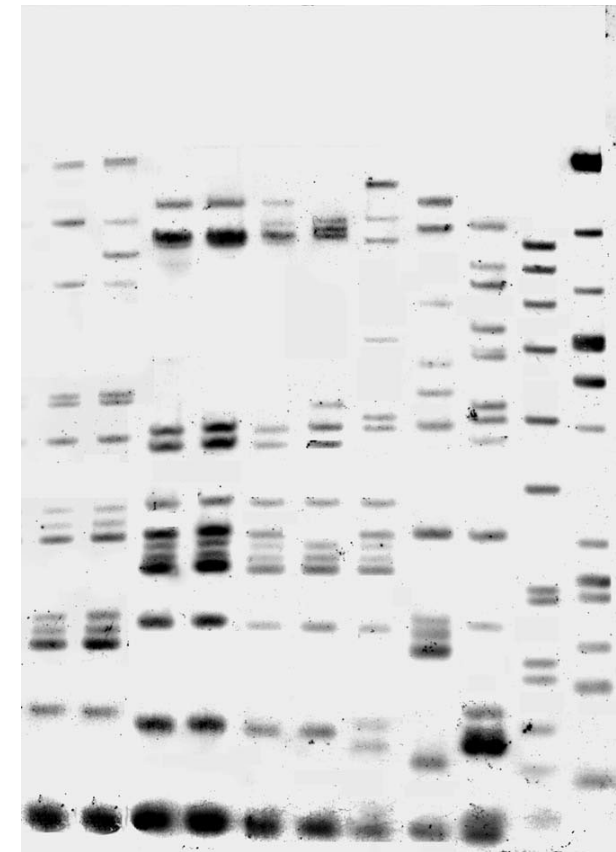
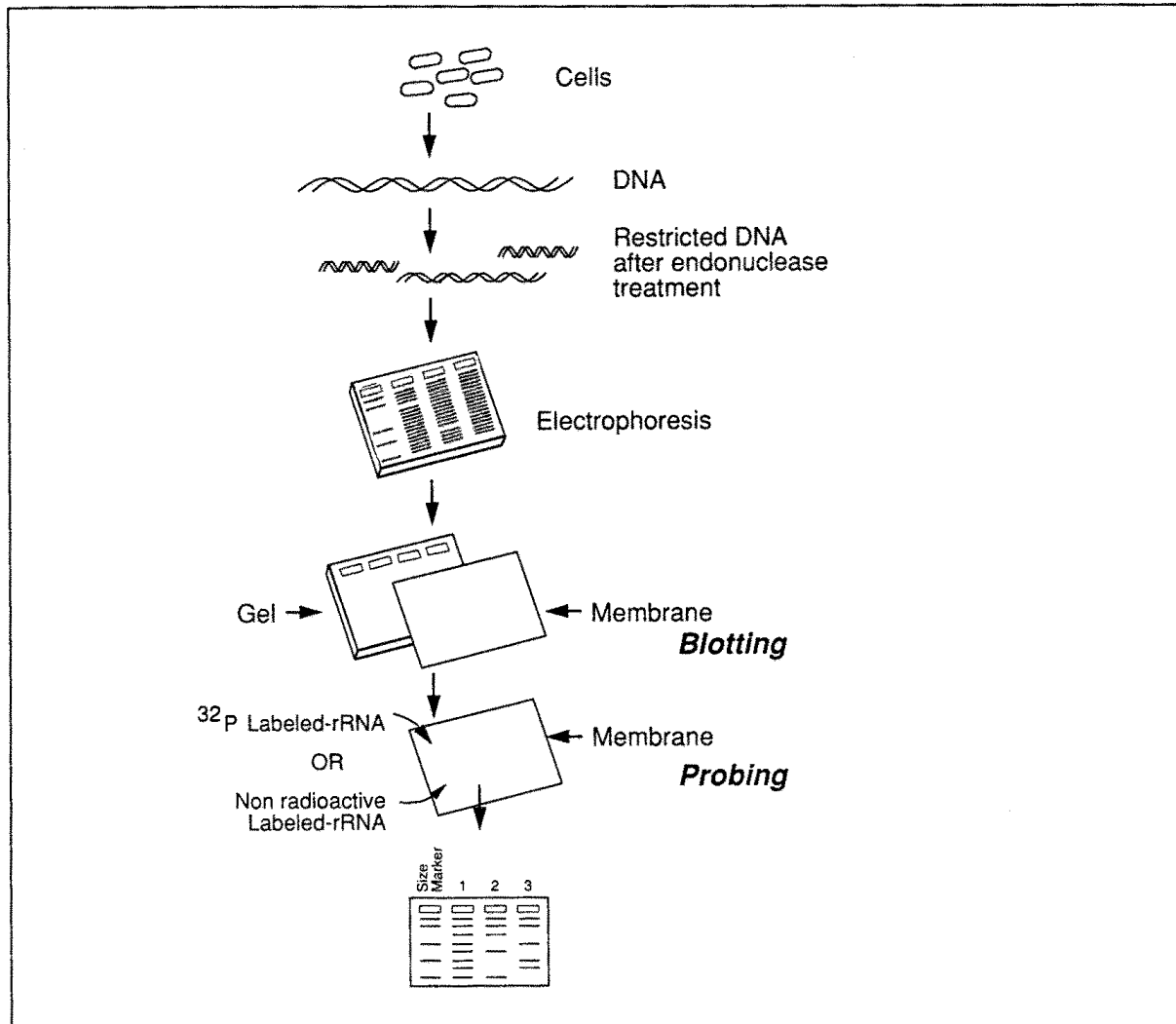


Southernova analýza potomků heterozygotních rodičů (RFLP)



Pokud je výskyt většího fragmentu spojen s nemocí je třeba sledovat dceru #1, sourozenci #2 a 3 jsou přenašeči

Princip selektivní hybridizace



Příklad hybridizace se sondou specifickou pro 16S rDNA.

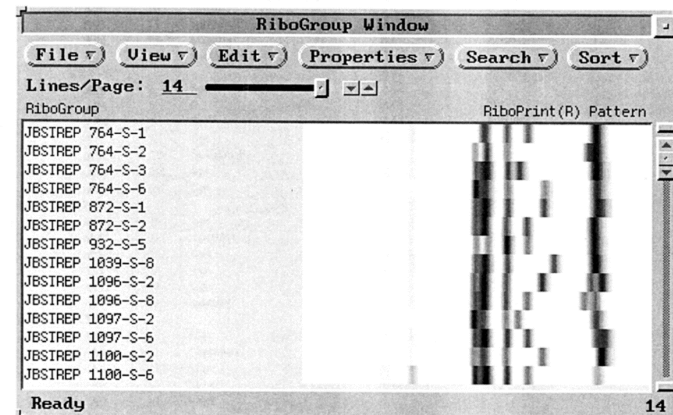
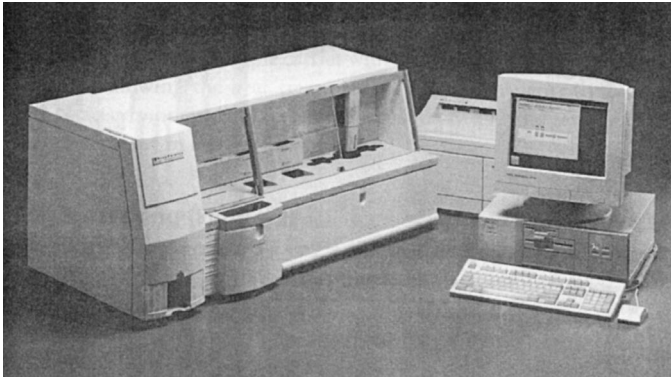
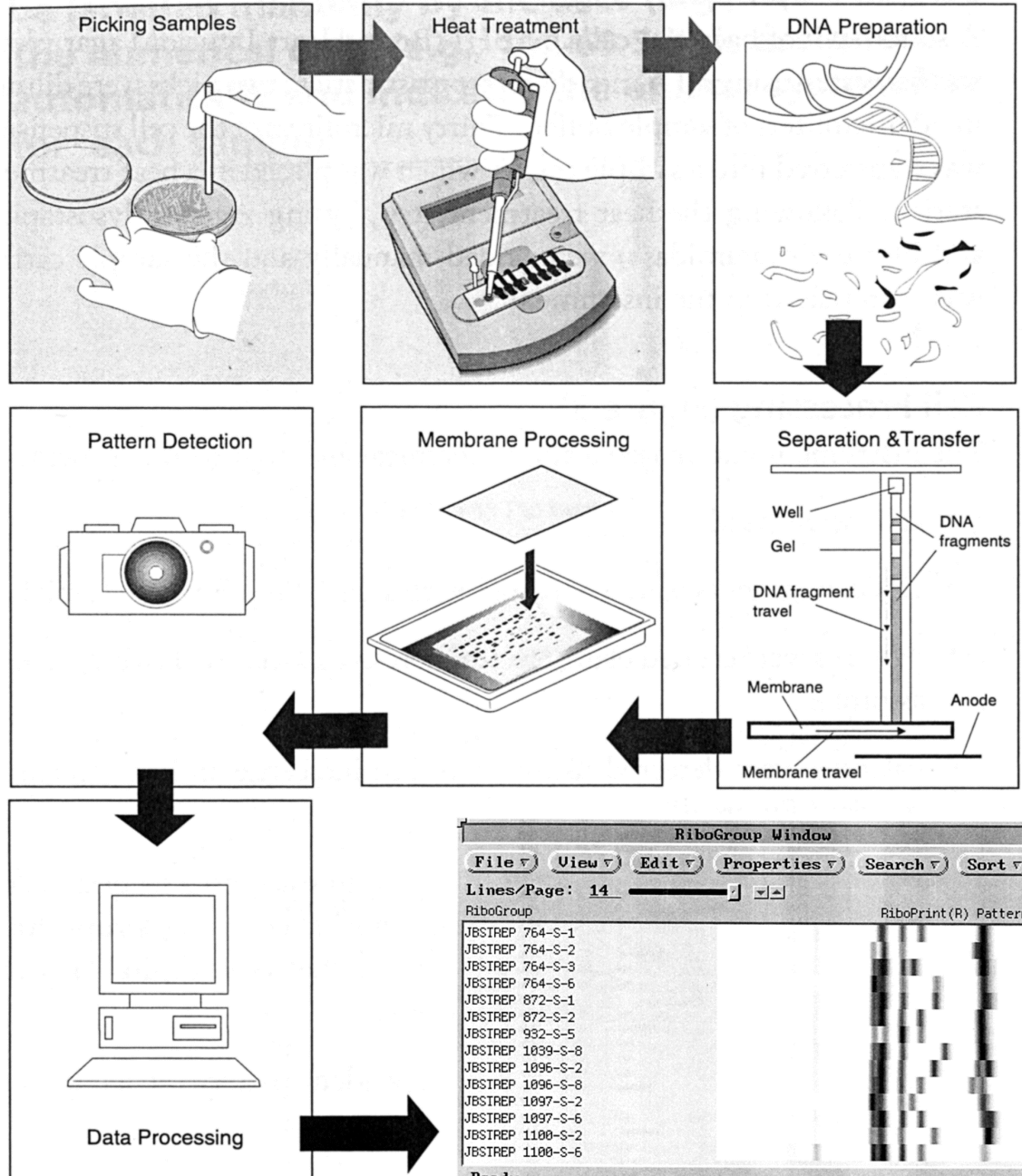
Princip ribotypizace

- Ribotypizace zahrnuje fingerprinting restričních fragmentů genomové DNA, které obsahují celý nebo část genu kódujícího 16S a 23S rRNA.
- Hlavní výhody ribotypizace:
 - Sekvence genů pro ribozomální RNA jsou velice konzervativní, proto pro ribotypizaci všech Eubakterií může být použita jediná sonda.
 - Jelikož většina bakterií obsahuje několik ribozomálních operonů, získáme po hybridizaci dostatečné množství fragmentů umožňující mezidruhové i vnitrodruhové odlišení kmenů.

Automatizace ribotypizace

RiboPrinter™ System Work Flow

EXTERNAL TO RIBOPRINTER™ SYSTEM



Sondy používané pro SRFH u eukaryot

■ Jednolokusové sondy

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

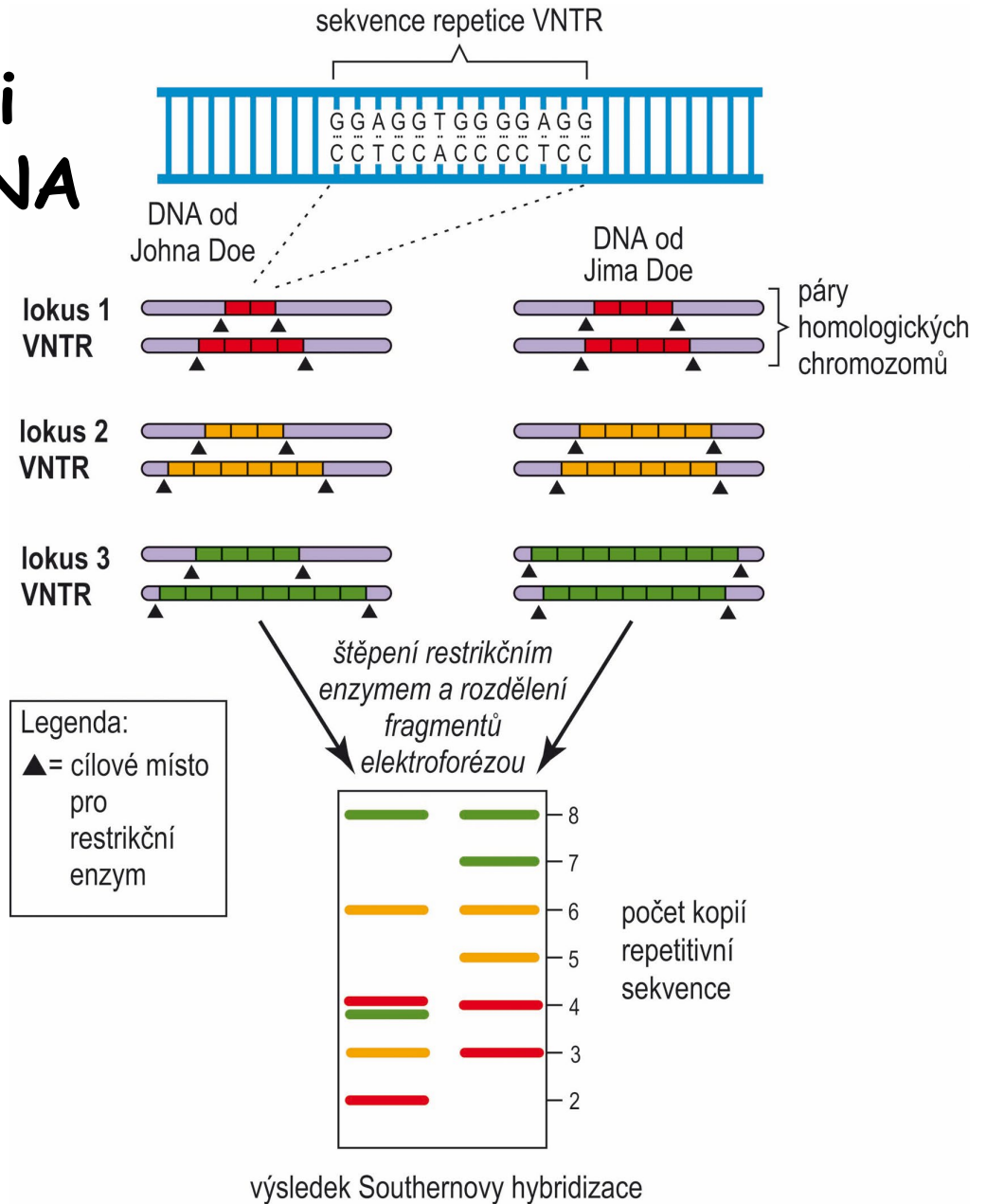
■ Mnoholokusové sondy

- Hybridizují k repetitivním sekvencím vyskytujícím se s četností 100 - 1000 v genomu
- Při Southernově hybridizaci se detekuje 20 - 30 proužků
- U člověka se využívá minisatelitů, z nichž 60 má společnou konvenční sekvenci
- Délka repeticí u každé z alel je polymorfní
- Pravděpodobnost, že 2 jedinci budou mít stejnou délku 1 repetice po štěpení restriktázou *HinfI* je 0,25.
Pokud uvažujeme 36 detekovatelných lokusů (proužků), je pravděpodobnost výskytu stejného vzoru

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

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

Využití VNTR při přípravě profilu DNA

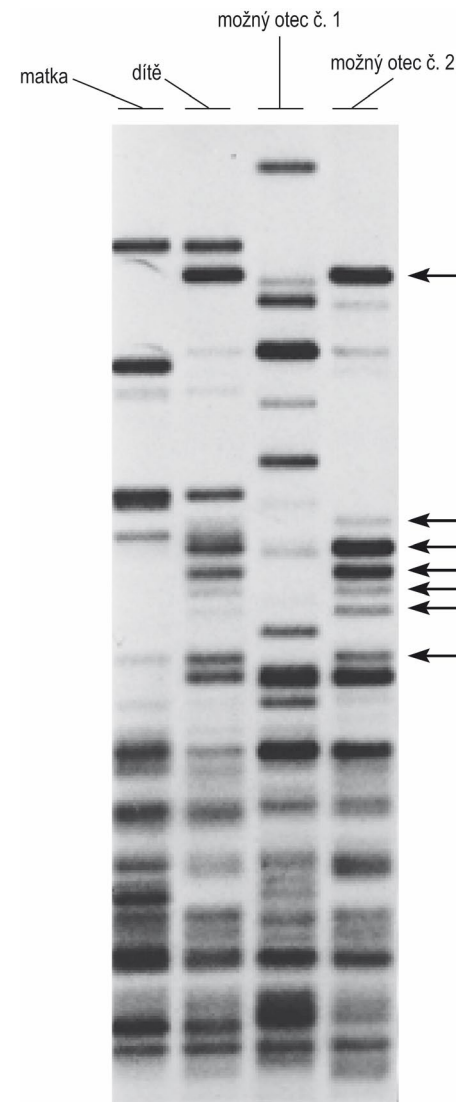


Vytváření profilů DNA při identifikaci osob

- založeno na předpokladu, že s výjimkou jednovaječných dvojčat neexistují dvě osoby s identickou sekvencí nukleotidů
- lidský genom obsahuje mnoho rodin polymorfizmů DNA, které lze využít k vytváření profilu DNA (otisk, „DNA fingerprint“)
- jde o krátké sekvence, které se vyskytují v podobě tandemových repetací různé délky - tandemové repetice variabilního počtu (VNTR, variable number of tandem repeats)
- profil DNA je specifický soubor pruhů získaných Southernovou hybridizací genomové DNA, která byla štěpena specifickým restriktivním enzymem
- profil DNA lze připravit z minimálního množství krve, spermatu, vlasových nebo jiných buněk po amplifikaci pomocí PCR

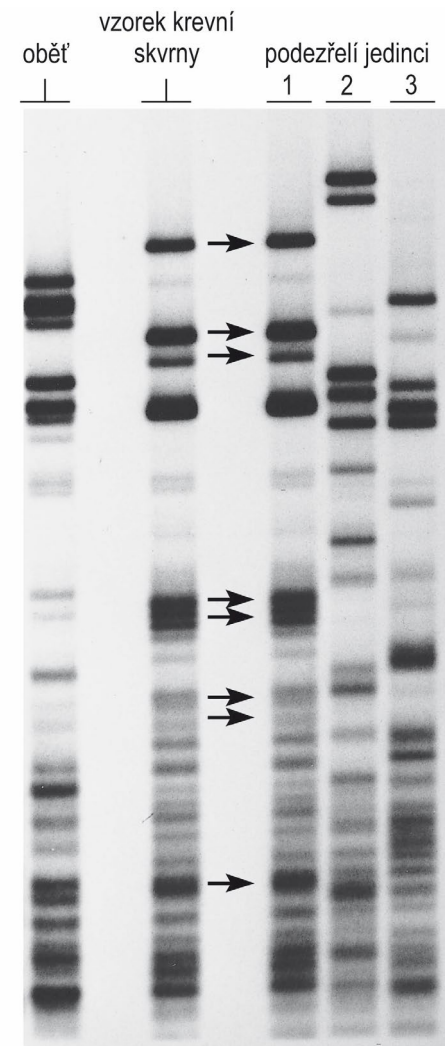
Využití VNTR při testování otcovství

- izolace DNA z buněk otce, matky a dítěte
- štěpení DNA, elektroforéza, Southernův přenos
- všechny pruhy v zobrazení profilu DNA dítěte by měly být přítomny v kombinaci profilů jeho rodičů
- lze použít více sond

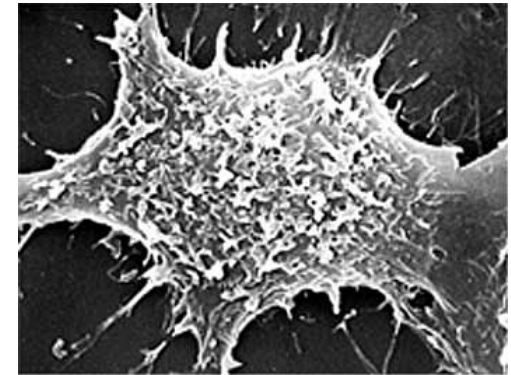
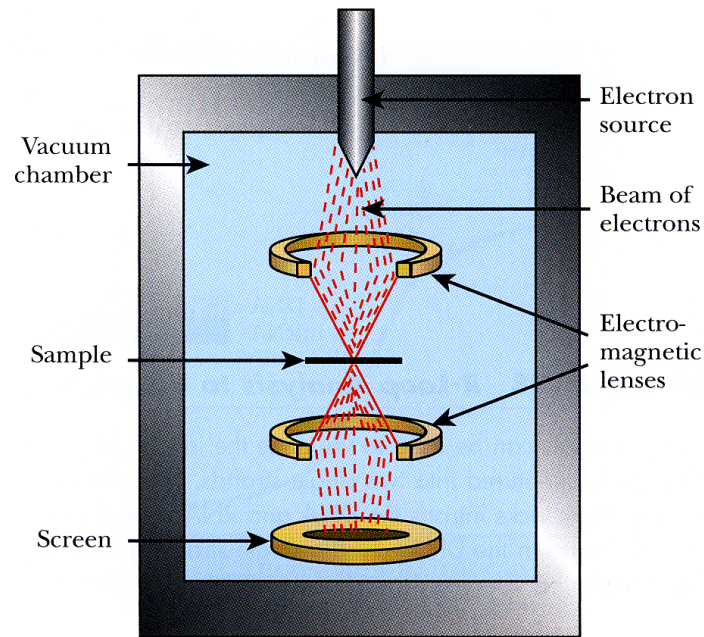


Soudní vyšetřování

- profil DNA se používá pro identifikaci zločinců od roku 1988
- biologické vzorky testovány v kriminalistice
- pravděpodobnost shody profilů dvou různých osob je $1:10^9$

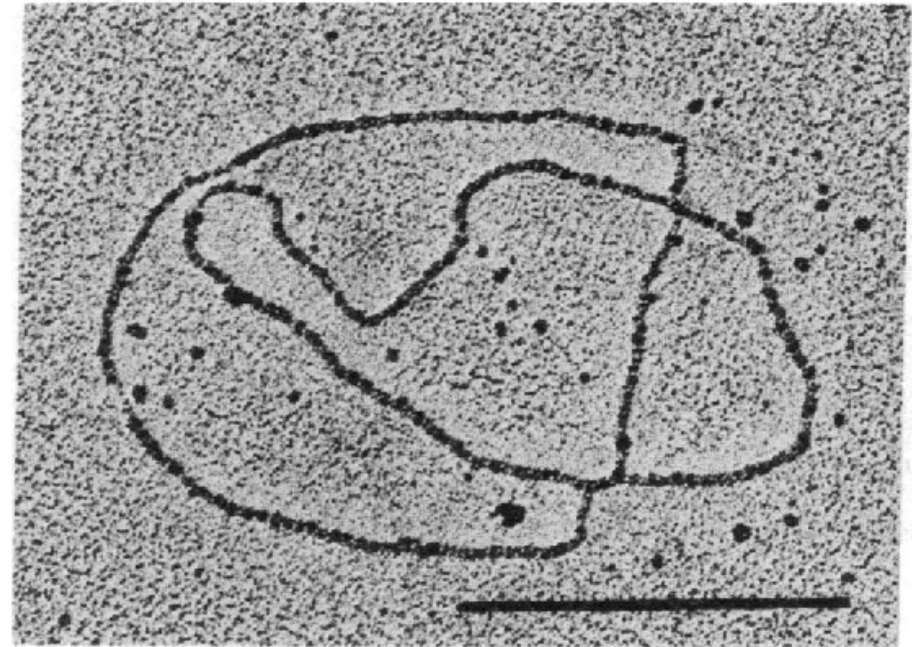
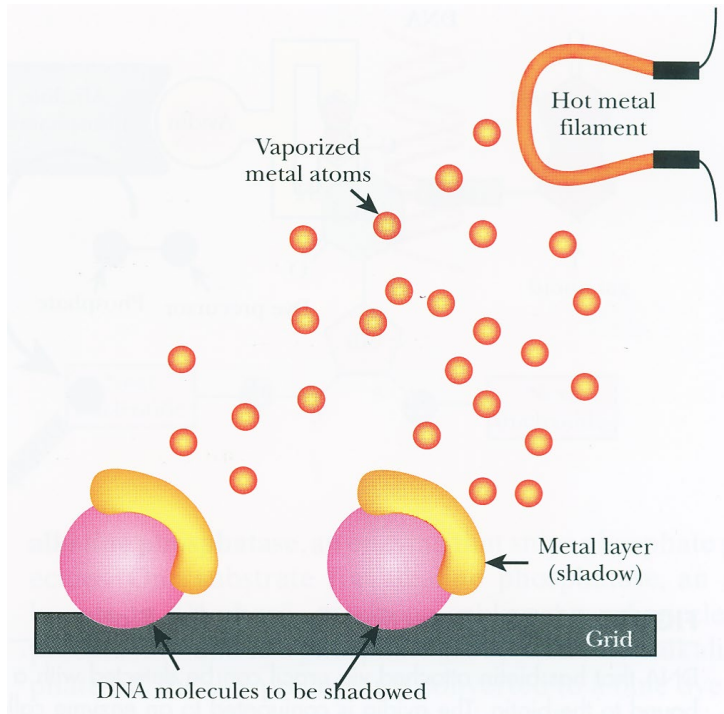


Sledování nukleových kyselin elektronovou mikroskopií



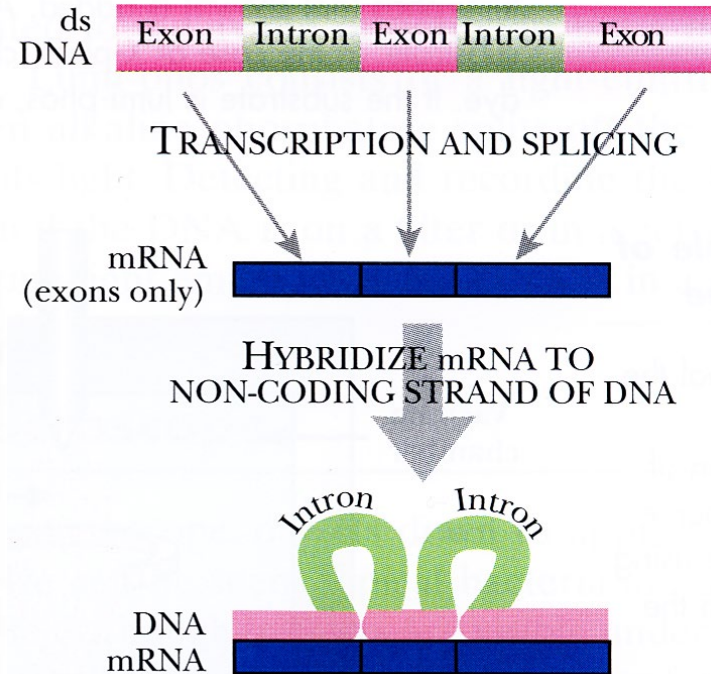
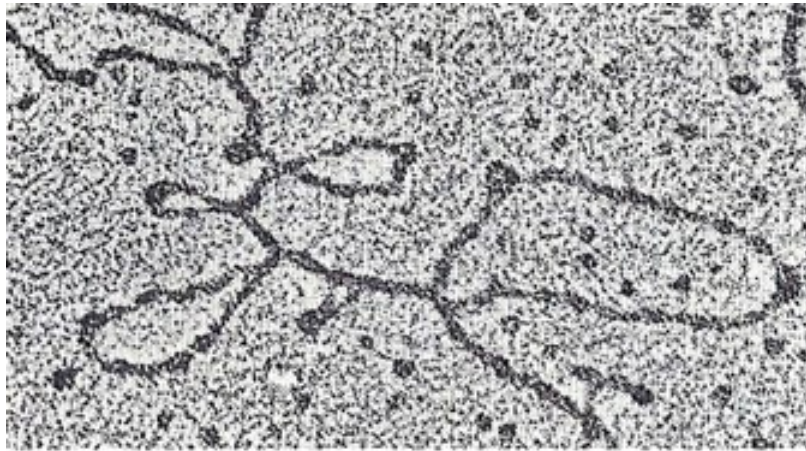
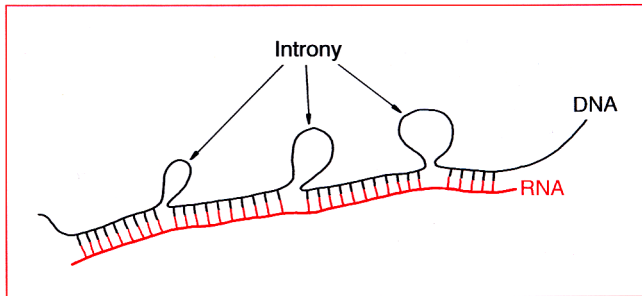
- paprsek elektronů má menší vlnovou délku než viditelné světlo - proto má EM vyšší rozlišovací schopnost než světelná mikroskopie
- zaostření paprsků elektronů je možné elektromagnetickými čočkami (ne skleněnými)
- materiály absorbující elektrony účinněji jsou ve výsledném obrazu tmavší

Sledování nukleových kyselin elektronovou mikroskopií



- neošetřené molekuly nukleových kyselin nelze pozorovat EM - úroveň absorpce elektronů je nízká
- musí se nejprve pokrýt atomy kovu (zdrojem je kovové vlákno ze zlata, platiny nebo wolframu)

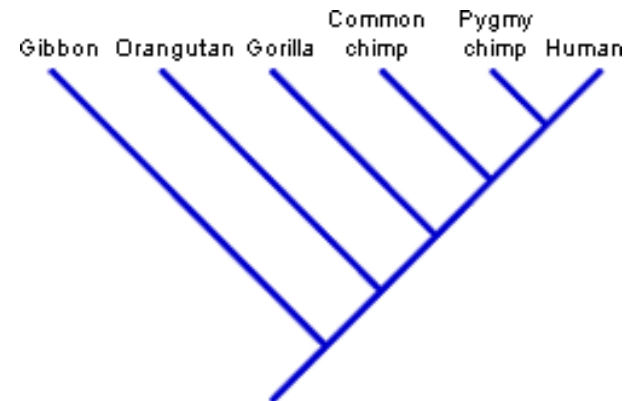
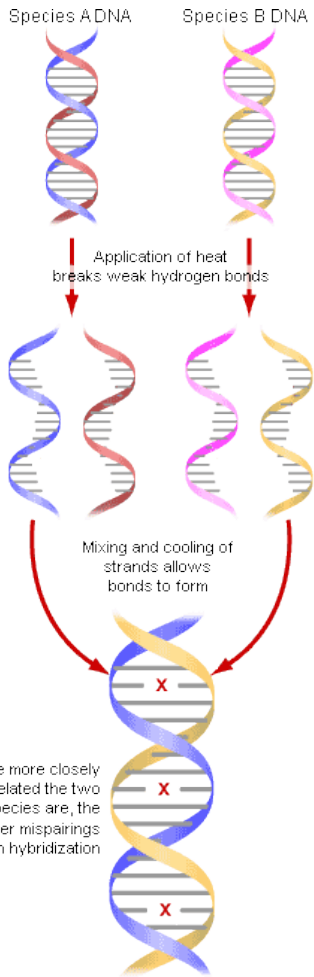
Sledování hybridizace elektronovou mikroskopií



- sledování hybridů DNA-RNA se používá pro studium přítomnosti intronů
- počet a poloha smyček odpovídá počtu a poloze intronů

Testování podobnosti DNA

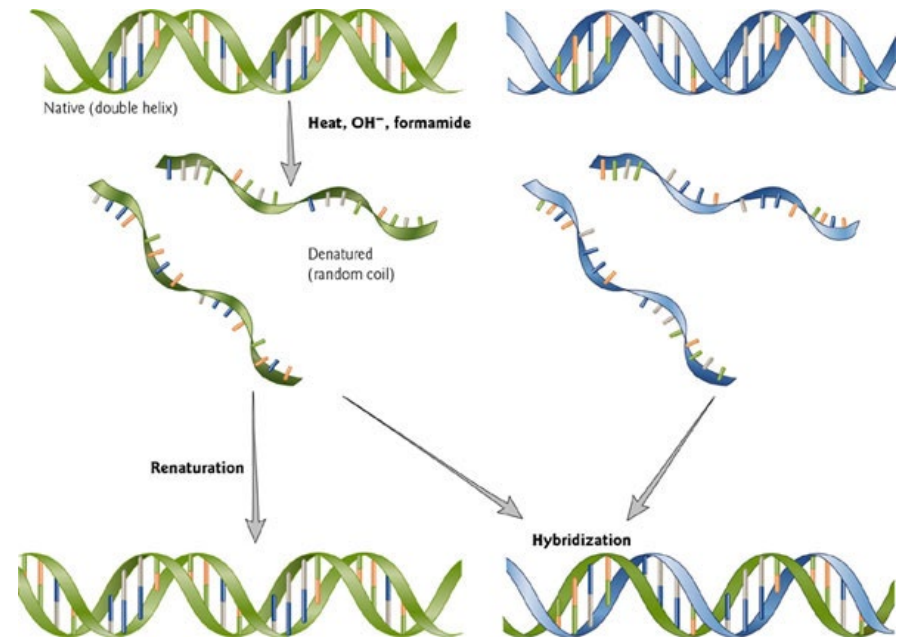
- na základě hybridizace DNA-DNA
- studium příbuznosti organismů - základ pro studium jejich evolučních vztahů, tvorbu fylogenetických stromů
- otcem metody je Charles Sibley
- touto metodou bylo zjištěno, že lidská a šimpanzí DNA je více příbuzná než vzhledem k DNA orangutanů a goril



Testování podobnosti DNA

Postup:

- štěpení DNA na malé fragmenty a jejich separace (denaturace)
- smísení denaturovaných DNA ze srovnávaných vzorků



- renaturace méně příbuzných řetězců nebude perfektní, stabilita hybridů bude odpovídat míře komplementarity řetězců - lze prověřit podle míry energie nutné pro jejich opětovou separaci
- DNA hybridy příbuzných řetězců budou denaturovat při vyšších teplotách

Profily tání („melting profiles“)

- DNA 1 se naváže filtr kolony
- přidá se DNA 2, dojde k hybridizaci
- směs se postupně zahřívá (teplota se zvyšuje po malých intervalech)
- po každém intervalu se kolony promyje
- fragmenty, které „roztají“ se stanou jednořetězcovými a odmyjí se
- teploty, při kterých se DNA odmyje, odrážejí míru podobnosti sekvencí

