

2. DNA sondy

Definice, značení sond a detekce

DNA sonda

- je sonda hybridizační (hybridisation probe, probe)
- Definice: Radioaktivně nebo neradioaktivně značená sekvence nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) používaná k vyhledávání nukleové kyseliny s komplementární sekvencí

Sonda chemická

- Látka vázající se specificky na určité báze nebo na určité lokální struktury v nukleových kyselinách (např. OsO₄, glyoxal, chloracetylaldehyd, diethylpyrokarbonát, hydroxylamin)

DNA sonda připravená z bakteriální DNA

- Pro průkaz enterotoxigenní *E. coli*
- Představovala první praktickou aplikaci technologie rekombinantní DNA (hybridizace kolonií)
- Při průkazu infekčního agens v klinickém materiálu
- (Moseley et al. J. Infect. Dis. 142, 892-898, 1980)

Hybridizace nukleových kyselin

- 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 nedochází ke spojování jednořetězců, které původně byly součástí téže molekuly)

Denaturace a renaturace/hybridisace DNA

- Obr.

Stringence (těsnost, přísnost) hybridizace

- Má vztah k počtu nekomplementárních bází, které mohou být během opětného vzniku dvoušroubovice tolerovány
- Je ovlivňována prostředím, v němž probíhá hybridizace

Faktory ovlivňující hybridizaci

- Teplota, koncentrace solí a pH
- Specificita hybridizace se zvyšuje v pufru o nízké koncentraci solí, vyšším pH a při vyšší teplotě
- Specificitu hybridizace lze zvýšit chemickými látkami (např. formamidem – snižuje hydrofobní interakce mezi basemi a jejich nespecifické párování)

T_m

- Je teplota, při které jsou sonda a cílová sekvence z 50% denaturovány
- $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 \log M + 0,41 (\%GC)$
- M... iontová síla pufru v molech/l
- Přibližné T_m
- $T_m = 4x (\text{počet GC}) + 2 (\text{počet AT})$

Srovnání hybridizace za různě stringentních podmínek

- Obr.

Za podmínek nízké stringence

- Se sonda specifická pro 16S r RNA sekvenci *Staphylococcus aureus*
- Může vázat na příbuzné sekvence jiných druhů *Staphylococcus*, jsou-li v analyzovaném vzorku přítomny
- To vede k falešně pozitivním výsledkům
- ! Podmínkám hybridizace musí být věnována mimořádná pozornost
- Na druhou stranu za podmínek nízké stringence můžeme vyhledávat příbuzné sekvence genů

Hybridizace je využíváno

- K vyhledávání a charakterizaci specifických nukleotidových sekvencí
- V genových/genomových knihovnách
- V cytologických preparátech
- Při mapování genomu atd.
- DNA/DNA hybridizace
- DNA/RNA hybridisace
- RNA/RNA hybridisace

Příprava sondy

- Tj. příprava jednořetězcové značené nukleotidové sekvence DNA nebo RNA
- Která se váže na cílovou sekvenci
- A kterou lze podle značky sondy identifikovat

Jako sondu lze použít

- Jakoukoliv vhodně označenou molekulu DNA nebo RNA

Velikost sondy

- Může být různá
- Obvykle bývá 100 – 1000 bp

Pro přípravu sond se nejčastěji používají

- Celková DNA
- Plasmidová DNA
- Sekvence genomové DNA nebo cDNA klonované ve vektoru
- Nebo amplifikované v PCR
- Uměle syntetizované nukleotidy o délce 15-70 bází (jejich sekvence může být odvozena ze sekvence AK proteinu, jehož kódující oblast na DNA vyhledáváme)
- Sekvence genů příbuzných organismů, u nichž existuje vysoká pravděpodobnost, že připravená sonda rozezná sekvenci homologních genů

Příklady komerčně dostupných sond

- Pro přímý průkaz patogenních mikroorganismů a virů či pro konfirmační testy
- Obr.

Značení sond

- Radioaktivní značení
- Neradioaktivní značení

Při radioaktivním značení

- Jsou do sekvence sondy začleněny nukleotidy (dATP), obsahující radioaktivní izotop (^3H , ^{32}P , ^{35}S)
- Signálem sondy je radioaktivní záření, které lze detekovat pomocí scintilačního stanovení radioaktivity v roztoku nebo autoradiograficky

Autoradiografie

- Detekce a lokalizace radioaktivní značky zabudované na pevném nosiči
- Využívá změn fotografické emulze (ionty Ag), které jsou vyvolány záření, emitovaným izotopem (β - částice ^3H , ^{14}C , ^{35}S , ^{32}P , γ - částice ^{125}I)
- Po vyvolání fotografické emulze se získá negativ s černými skvrnami v místě, kam doletěly emitované paprsky
- Snížení teploty na -70°C zvyšuje stabilitu atomu Ag a tím se prodlouží doba pro zachycení druhého fotonu.

Dva typy autoradiografie

- Přímá – vzorek se umístí přímo na film
- Nepřímá – záření je převedeno na světlo pomocí scintilátoru, jímž je napuštěna speciální deska. Radioaktivní záření přenáší energii na molekuly scintilátoru, ty emitují fotony, které ozařují fotografickou emulsi.
- (Ukázka desek)

Při neradioaktivním způsobu značení

- Jsou do sekvence sondy zabudovány chemicky modifikované nukleotidy nesoucí reportérskou molekulu, která umožňuje přímou nebo nepřímou detekci sondy

Neradioaktivní značení sond a jejich detekce

- Enzymové značení sond – enzymy alkalická fosfatáza AP, křenová peroxidáza POD, luciferáza – detekce s využitím specifického substrátu
- po přidání substrátu katalyzuje příslušný enzym reakci, jejichž výsledkem je podle povahy substrátu změna jeho barvy - kolorimetrická detekce – nebo změna rozpustnosti, nebo emise světla
- (Substrátem pro AP je BCIP-NBT (5-bromo-4chloro-3-indolylfosfát-NitroBlueTetrazolium))

Využití afinitních značek

- biotin, digoxigenin navázané na nukleotid (dUTP) a inkorporovány do sond
- detekce s využitím streptavidinu nebo avidinu nebo protilátky s příkonjugovaným enzymem AP, POD

Obr.

- Hybridizace s využitím biotinylované sondy a detekce

Využití chemiluminiscentních molekul

- chemiluminiscentní molekuly (např. estery akridinu, které emitují světlo po vystavení určitým substrátům - detekce pomocí specifického filmu nebo luminometru)

Obr.

- Chemiluminiscentní detekce cílové DNA

Vysvětlení chemické podstaty značek

- Biotin – vitamin H (řadí se do skupiny vitaminů B, je přítomen ve všech b.)
- Digoxigenin – rostlinný steroid (Náprstník)
- Avidin- bílkovina ve vaječném bílku
- Streptavidin – bakteriální protein izolovaný ze *Streptomyces avidinii*

Využití fluorescenčních molekul

- Fluorescenční molekuly (např. fluorescein, rhodamin)
- fluorescenční značky různé barvy lze detekovat ve fluorescenčním mikroskopu

Výhody neradioaktivně značených sond

- Výhody: bezpečnost práce
- delší životnost sondy (stabilní několik měsíců až rok) (radioaktivně značené sondy mají krátkou životnost – dle použitého izotopu a jeho poločasu rozpadu)
- Rychlejší výsledek

Výhody afinitních sond

- Využívají nepřímou generaci signálu
- Specifická aktivita sondy (tj. počet inkorporovaných afinitních skupin/1 sondu) není tak významná jako dostupnost těchto afinitních skupin pro následující detekci po hybridizaci
- Velkou výhodou afinitních značek je, že pro stejnou značku mohou být použity různé systémy generující signál (např. u sondy značené biotinem může být použit avidin s připojenou fluorescenční skupinou nebo s enzymem (AP, POD))

Nevýhody neradioaktivně značených sond

- Nevýhody: nižší citlivost (výsledky získané s radioaktivními sondami jsou považovány za standardy maximální citlivosti)
- Obtížná kvantifikace

Metody značení sond

- Bud' po celé délce fragmentu NK
- Nebo na jejím konci (koncové značení)
- S využitím značených nukleotidů, které se přidávají do reakční směsi

Značení nukleotidů

- Radioaktivní – např. na fosfátové skupině dNTP je zabudován radioaktivní isotop – Obr.
- Neradioaktivní značka (např. digoxigenin) bývá přisyntetizována na bázi přes můstek (spacer), aby nebyla ovlivněna hybridizace – Obr.

Metoda posunu jednořetězcového zlomu („nick translation“)

- Vnitřní značení, pro fragmenty větší
- Na ds DNA se vytvoří DNázou náhodné ss zlomy
- Ty jsou substrátem pro působení **DNA-polymerázy**
- odstraňuje svou exonukleázovou aktivitou nukleotidy od místa zlomu ve směru 5'-3'
- a současně ve stejném směru připojuje nukleotidy k 3'konci zlomu
- Značka musí být u dNTP na fosfátové skupině alfa

Metoda prodlužování primeru

- S využitím náhodných oligonukleotidů (hexamery), u fragmentů kratších
- Výchozí molekula je denaturována
- K ss molekulám se přidá směs synteticky připravených hexamerů s náhodnou sekvencí (random priming)
- Tyto oligonukleotidy se při hybridizují k různým místům DNA a slouží jako primery pro syntézu komplementárního řetězce **Klenowovým fragmentem** DNA polymerázy,
- která postrádá 5'-3' exonukleázovou aktivitu (aby se zabránilo odbourávání primerů)
- Lze využít rovněž zpětnou transkriptázu
- Obr.

Značení pomocí PCR s využitím primerů o známé sekvenci

- Jako matrice slouží naklonované fragmenty DNA nebo celková genomová DNA
- Pomocí PCR a značených dNTP lze získat sondu z přesně definovaného úseku DNA, vymezeného místem připojení primerů
- K polymerazi se používá **Taq DNA polymeráza**

Značení transkripcí *in vitro*

- Když je DNA naklonována za promotor
- Jako sonda se použije RNA transkript dané sekvence DNA vzniklý za přítomnosti ribonukleotidů – RNA sonda
- S využitím reverzní transkriptázy lze získat cDNA sondy

Koncové značení řetězců na 5'konci

- Pro značení synteticky připravených oligonukleotidů nebo restričních fragmentů
- Značení na 5'koncích nejčastěji radioaktivním fosfátem pomocí **polynukleotidkinázy** (v ATP radioaktivně značena fosfátová skupina gama)
- Lze značit ss i ds DNA molekuly
- Obr.

Koncové značení řetězců na 3'konci

- 3'konce lze značit metodou doplnění konců – k přesahujícím jednořetězcům na koncích restričních fragmentů jsou dosyntetizovány komplementárně označené nukleotidy enzymem **DNA polymerázou**
- K 3'koncům lze připojit značené nukleotidy působením **terminální transferázy**
- Nukleotidy nesou značku na fosfátové skupině alfa

Pro přípravu hybridizačních sond

- Může být použita peptidová nukleová kyselina (PNA)
- Molekula analogická DNA
- její kostru tvoří opakující se N-(2-aminoethyl)-glycinové jednotky spojené peptidovou vazbou
- Báze se na kostru vážou metylenkarbonylovými skupinami
- PNA napodobuje chování DNA

PNA sondy

- Jsou vysoce afinitní k DNA a průběh hybridizace je velmi rychlý
- Interakce PNA:DNA je vysoce selektivní, může probíhat při laboratorní teplotě a může ji destabilizovat pouhý 1 chybný pár bazí
- Sondy tohoto typu jsou vhodné pro detekci jednonukleotidových polymorfismů.
- Jsou značeny barvivem, které po vazbě sondy na DNA fluoreskuje až 50x intenzivněji než u nenavázané sondy a signál je proto viditelný i pouhým okem.

- PřF 5.10.2010