

Experimentální uspořádání při hybridizacích

Č.3

Hybridisace v roztoku, na pevném podkladu, in situ hybridizace a jejich využití

Experimentální uspořádání u hybridizací

- Hybridizace se mohou provádět
- (1) v roztoku
- (2) na pevných podkladech
- (3) v preparátech buněk či tkání (*in situ*)
- Obr.



Hybridizace v roztoku

- V tomto experimentálním uspořádání jak cílová nukleová kyselina tak sonda volně interagují v reakční směsi, což urychluje tvorbu ds molekul
- Postačuje relativně malé množství vzorku

Optimální výsledky jsou dosahovány

- S dostatečně purifikovanou DNA
- A se sondou, která nevytváří vlásenky

Vzorek obsahující hybridisované molekuly

- Lze vystavit působením S1 nukleázy, která je specifická pro ss DNA a neštěpí ds DNA
- ds DNA může být ve vzorku stanovena kvantitativně po precipitaci kys. trichloroctovou nebo po navázání na hydroxyapatitové kolonky, na něž se váže ds DNA.

Hybridizace v roztoku se dá použít

- Ke stanovení počtu kopií specifického genu – Obr.
- K subtraktivní DNA/RNA hybridisaci, která umožňuje zjistit rozdíly v transkripci genů příbuzných buněk např. T a B lymfocytů – Obr.

Přísné podmínky hybridizace

- Umožňují vytvoření duplexů z jednořetězců, jejichž sekvence jsou zcela komplementární nebo mají vysoký stupeň podobnosti
- Teplota, při níž hybridizace probíhá je asi o 5°C nižší než je T_m .

Tvorba dvouřetězců

- Je ovlivněna tím, zda vzájemně hybridizují molekuly DNA nebo RNA.
- Stabilita hybridů klesá v pořadí:
 - RNA/RNA
 - RNA/DNA
 - DNA/DNA

Provádění hybridizace za méně přísných podmínek

- Pokud není sekvence sondy plně komplementární k vyhledávané sekvenci (např. při vyhledávání příbuzných sekvencí), provádí se hybridizace za málo přísných podmínek
- Těch se dosáhne snížením teploty hybridizace (asi 40°C pod hodnotu T_m)

K hybridizaci může dojít

- I v případě, je-li v roztoku sonda imobilisovaná na pevný nosič (např. paramagnetickou kuličku)
- Využívá se v DNA diagnostice

Hybridizace na pevných podkladech

- Jsou nejvíce používány

Rozlišujeme

- 3 základní typy hybridizace na pevných podkladech
- Hybridizace kolonií nebo fágových plak
- Tečková (kapková) či čárková hybridizace
- Hybridizace po přenosu NK na membránu

Hybridizace kolonií nebo plak

- Na membránu se přenáší nukleové kyseliny bezprostředně uvolněné z bakteriálních kolonií nebo plak bakteriofágů vyrostlých na agarových miskách
- Obr.

Tečková (kapková) hybridizace

- Na hybridizační membránu je nanášen vzorek denaturované nukleové kyseliny ve formě kapek nebo čárek (dot blot, slot blot hybridizace)

Hybridizace po elektroforetické separaci nukleových kyselin a přenosu na membránu

- Nukleové kyseliny jsou zachyceny na membráně v místech odpovídajících jejich polohám v gelu po elektroforéze.
- Denaturovaná DNA nebo RNA se přenáší na pevný podklad (nitrocelulózový filtr, nylonová membrána)

Podle toho, jakým způsobem k přenosu NK na membránu dochází rozlišujeme

- Kapilární přenos – NK jsou unášeny pufrem prostupujícím gelem a hybridisační membránou
- Pohyb pufru je zajištěn kapilárními silami, které vyvolává savý materiál navrstvený na membránu
- Obr.

Elektroforetický přenos

- Je podmíněný vlivem elektrického pole. Používá se zejména při přenosu nukleových kyselin a proteinů z polyakrylamidových gelů

Vakuový přenos

- Gel je položen na membránu umístěnou na pórovité podložce a přelit roztokem, který je pak nasáván pumpou.
- Výhodou je zejména rychlost přenosu.

Podle typu přenášených molekul se rozdělují

- Přenos DNA neboli Southernův přenos (podle E.M. Southerna)
- Přenos RNA neboli northernový přenos (slovní hříčka)
- Přenos proteinů neboli westernový přenos

Po přenosu

- Jsou molekuly NK irreverzibilně navázány na membránu (jednořetězce přístupné sondě)

Hybridizace se sondou

- Zahrnuje následující kroky:
- Prehybridizaci (přídavkem vhodných látek – heterologní DNA, tRNA, proteiny) se obsadí volná místa na membráně a zabrání se tak nespecifickému navázání sondy
- Vlastní hybridizaci – po aplikaci roztoku se sondou
- Promývání (odmyje se nenavázaná sonda)
- Detekce navázané sondy (podle způsobu značení např. imunochemicky (s využitím protilátky))

Detekce specifického restrikčního fragmentu DNA

- po Southernově přenosu na membránu
Obr.

Rehybridizace

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

Použití DNA/RNA hybridisace

- K určení nekódujících úseků DNA (intronů) ve fragmentu DNA
- Obr.

Využití DNA/DNA hybridisace pro RFLP analýzu

- Obr.

Hybridizace *in situ*

- Umožňuje detekovat přítomnost specifických NK na sklíčku tj. v cytologických preparátech chromozomů, buněk nebo v řezech tkání
- A s vysokou přesností stanovit jejich prostorovou lokalizaci

Metodu lze použít

- Pro detekci genů na polyténních chromosomech hmyzu
- Na metafázních chromosomech savců a rostlin
- Pro lokalizaci interfázních chromosomů v b.
- Pro detekci specifických molekul mRNA uvnitř buněk a tkání

Identifikace mRNA pomocí

- In situ hybridisace – Obr.
- Původně byly sondy značeny radioaktivně a jejich detekce byla prováděna autoradiograficky

FISH

- Fluorescentní *in situ* hybridisace
- Sondy jsou přímo značeny fluorescenčně značenými nukleotidy
- Vizualizace navázaných sond se provádí fluorescenční mikroskopií

Použitím specifických sond

- Označených různými fluoreskujícími látkami lze např. na 1 chromosomu identifikovat polohy několika genů současně
- K znázornění dalších morfologických struktur se preparát obarví běžnými barvivy používanými v cytologii
- Obr.

? Dát do přednášky č. 2 Faktory ovlivňující stabilitu hybridů

- Zejména teplota
- Délka hybridizujících molekul
- Stupeň vzájemné komplementarity bazí
- Zastoupení GC a AT párů
- Koncentrace solí v roztoku
- pH roztoku
- Přítomnost látek destabilizujících vodíkové vazby mezi řetězci (např. denaturační činidla jako je formamid nebo močovina)