

SMAMII-8

Detekce polymorfismů v
genomech

Metody molekulární diagnostiky

- Se zaměřují na vyhledávání rozdílů v sekvencích DNA a
- Identifikaci polymorfismů v celkové genomové, chromozomové, mitochondriové, chloroplastové nebo plasmidové DNA
- Nebo polymorfismů specifických genů příp. jejich částí

Za předpokladu

- že rozdíly v sekvenci DNA ovlivňují určité fenotypové znaky
- mohou metody založené na identifikaci polymorfismů
- nahradit jiné diagnostické techniky (např. biochemické nebo sérologické)

Záměrem použití jednotlivých metod

- Je zpravidla identifikace nebo typizace studovaných vzorků DNA, které mohou poskytnout informace důležité pro
- rozlišení jedinců, vyhledání zdroje patogenních organismů, provedení preventivních opatření, léčbu choroby, pro fylogenetické studie.
- Metody založené na analýze DNA mají na rozdíl od fenotypových metod 100% typovatelnost, protože všechny organismy DNA obsahují

Genotypové diagnostické metody

- Se dělí na přímé a nepřímé
- Jsou rychlé
- Často nevyžadují předchozí kultivaci buněk

Přímé metody pro detekci polymorfismů v genomech

- Stanovuje se přímo sekvence variabilní oblasti DNA
- Časově náročnější

Nepřímé metody

- Zobrazuje se profil DNA konkrétního organismu ve formě otisku DNA (fingrprintu)
- Otisky DNA mohou mít podobu spekter restričních fragmentů
- Nebo produktů PCR rozdělených gelovou elektroforézou
- Nebo spekter restričních fragmentů hybridizujících ke specifické sondě
- Výsledné vzory mohou být hodnoceny vizuálně nebo analýzou obrazu s využitím výpočetní techniky

Nepřímé metody rozdělujeme

- Na techniky založené na amplifikaci DNA
- A na techniky, u kterých se amplifikace neprovádí např.
- Restrikční endonukleázovou analýzu (REA)
- Selektivní hybridisaci restrikčních fragmentů (SRFH)
- Techniky využívající rozdílnou elektroforetickou pohyblivost fragmentů DNA obsahujících standardní a mutantní varianty genu, které umožňují identifikaci konformačních polymorfismů nukleových kyselin a
- Techniky s vysokou rozlišovací schopností pro detekci jednonukleotidových polymorfismů (SNP)

Polymorfismus délky restričních fragmentů

- Využívá se rozdílů v restričních mapách jedinců téhož druhu
- Jedná se o rozdíly podmíněné různou délkou a počtem restričních fragmentů vytvořených štěpením genomové DNA (nebo její části) určitou restriktázou (RFLP)
- Jejich podstatou jsou buď mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě cílových míst pro restriktázu
- Nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu repetitivních sekvencí, delecí, insercí nebo přestaveb ve specifických oblastech chromosomu
- Rozdíly ve velikosti restričních fragmentů lze detekovat gelovou elektroforézou, která může být doplněna Southernovou hybridizací se sondami specifickými pro polyformní oblasti genomu
- Selektivní hybridizace umožní snazší interpretaci výsledků analýzy RFLP snížením počtu srovnávaných fragmentů

Při analýze prokaryotického genomu

- Metodami selektivní hybridisace 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 vicekopiových elementů typu inserčních sekvencí, transposonů 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

Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů

- Jedná se o rozdíly v délce amplifikační produktů vznikající při použití některých variant PCR (AP-PCR, REP-PCR, Alu-PCR, ITS-PCR)
- Podstatou tohoto polymorfismu jsou změny v sekvencích DNA pro vazebná místa primerů nebo delece a inserce v amplifikovaných sekvencích
- V užším slova smyslu je označení AFLP používáno pro jednu z typizačních metod, která využívá selektivní amplifikace souboru fragmentů DNA vytvářeného štěpením restriktaázami
- Stanovení AFLP je vhodné pro účely srovnávací typizace celkových genomových DNA a zpravidla nevyžaduje znalost sekvencí pro hybridizaci universálních primerů

Polymorfismus konformace jednořetězců (SSCP)

- Diagnostická metoda
- Využívá tvorby rozdílné sekvenčně specifické intramolekulární struktury ssDNA nebo ss RNA ovlivňujících mobilitu jednořetězců při nenedenaturujících elektroforetických podmínkách
- Analýzy SSCP je vhodná pro sledování změn v krátkých úsecích DNA libovolného původu (150 – 400 bází) připravených pomocí PCR (PCR-SSCP)
- Obvykle se používá pro detekci rozdílů mezirůznými alelami téhož genu
- SsDNA molekuly se připraví denaturací ds DNA molekul formamidem nebo teplem a rozdělí se elektroforézou v polyakrylovém gelu (nedenaturačním)
- ssŘetězce lišící se svou sekvencí byť i jedinou bází vytvářejí rozdílné sekundární struktury s různou elektroforetickou pohyblivostí, což umožňuje rozlišit polymorfní alely

Polymorfismus konformace dvouřetězců

- Denaturované produkty PCR jsou podrobeny pomalé renaturaci a vytvářejí duplexy DNA
- Duplexy, jejichž řetězce se vyznačují úplnou komplementaritou bazí (homoduplexy) a hybridní molekuly DNA, jejíž řetězce se vyznačují neúplnou komplementaritou bazí (heteroduplexy) mají v nedenaturujících gelech rozdílné elektroforetické pohyblivosti
- I v případě jediného chybného páru bazí může být heteroduplex zuřetelně zpomalen.
- Analýza pohyblivosti heteroduplexů (HMA) se používá k lokalizaci a detekci bodových mutací v genomech
- Její účinnost může být zvýšena elektroforetickou separací v denaturačním gradientovém gelu