



# Hybridizace

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2012**

# ***Obsah přednášky***

- 1) Způsoby provedení hybridizace**
- 2) Hybridizace v roztoku**
- 3) Příprava značených sond**
- 4) Hybridizace na pevném povrchu**
- 5) Southernův přenos**
- 6) Fluorescentní *in situ* hybridizace**



## *Doporučená literatura*

**Tentokrát se musíte spolehnout na základní literaturu + odkazy na odborné publikace uvedené v přednášce**

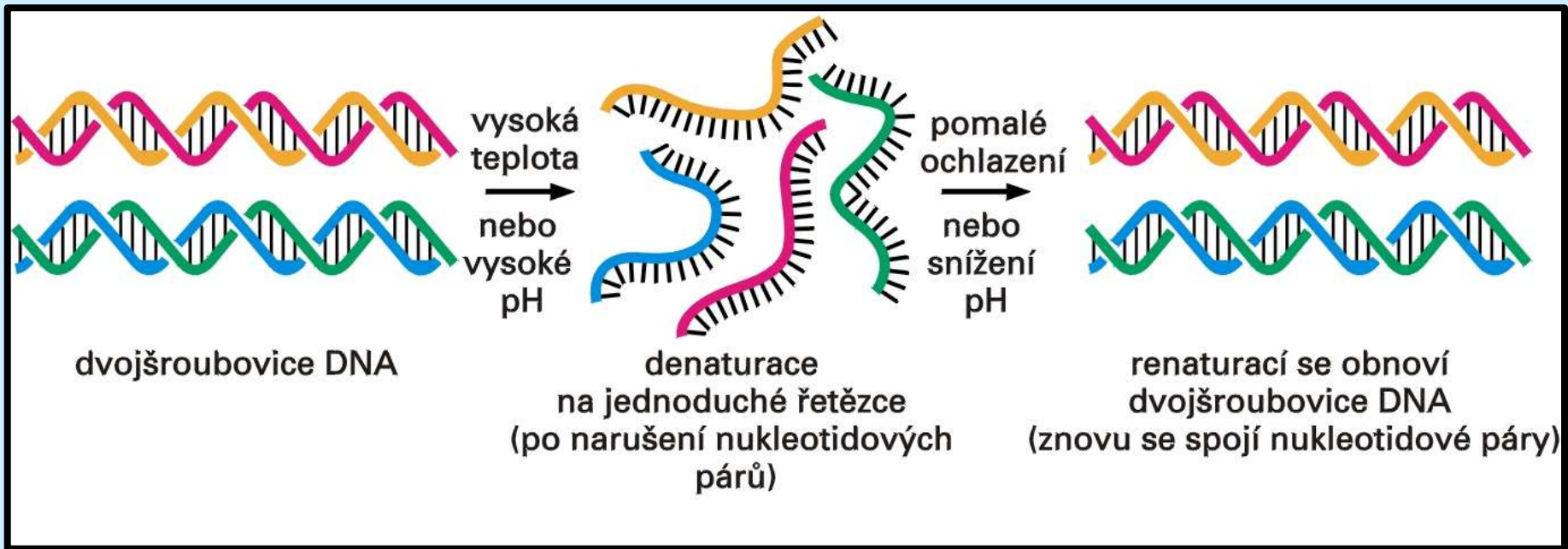
# Hybridizace

- reasociace dvou jednořetězcových DNA nebo RNA, pokud mají jejich sekvence úplně nebo částečně komplementární báze



- nemyslí se jí ale spojování jednořetězců, které byly součástí téže molekuly) = renaturace

# *Hybridizace je založena na schopnosti NA denaturovat a renaturovat*

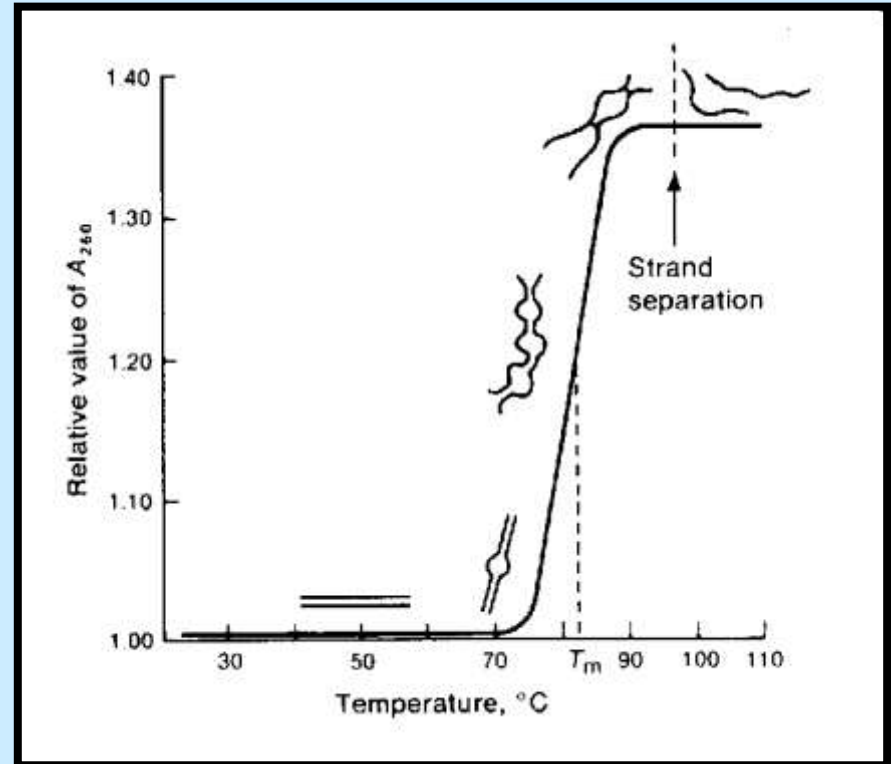


# ***Co to je denaturace DNA***

- **oddělení komplementárních vláken DNA působením vysoké teploty (90-100°C), extrémních hodnot pH nebo denaturačních činidel (formamid, močovina)**
- **Při denaturaci se zvyšuje absorpce světla při vlnové délce 260 nm (tzv. hyperchromní efekt)**
- **Je to důsledek změny v uspořádání bází**

# Co to je hyperchromní efekt

- **Spojené řetězce snižují absorbanci**
- **Při denaturaci absorbance stoupá o 30-40%**
- **Řetězce drží pevně pohromadě dokud se nedosáhne  $T_m$ , pak se duplex rychle rozpadá**



[http://members.tripod.com/arnold\\_dion/RecDNA/Fig1-7.gif](http://members.tripod.com/arnold_dion/RecDNA/Fig1-7.gif)

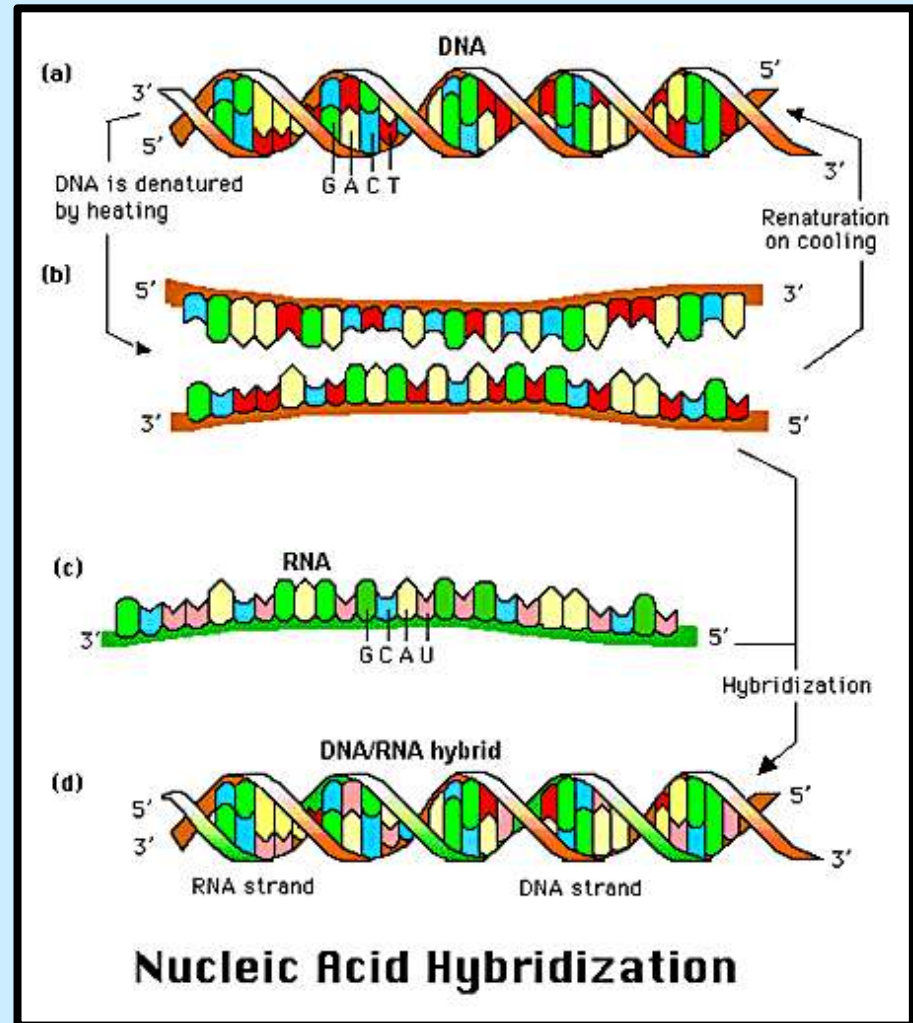


# Co to je renaturace DNA

- opětná tvorba dvouřetězcových struktur z jednořetězcových polynukleotidů za vhodných připojovacích („annealing“) podmínek
- nastává při pomalém ochlazení (65°C) roztoku teplem denaturované DNA
- nenastává při prudkém ochlazení roztoku denaturované DNA
- při renaturaci se mohou tvořit hybridní molekuly DNA/DNA, RNA/RNA i **DNA/RNA**
- rozsah renaturace odpovídá rozsahu komplementarity sekvencí

# Faktory ovlivňující tvorbu hybridů

- teplota
- koncentrace solí
- stupeň komplementarity
- délka fragmentů



# ***Využití hybridizace***

- **test komplementarity sekvencí (ve směsi mnoha molekul DNA budou hybridizovat jen ty, které jsou dostatečně komplementární)**
- **detekce molekul DNA a RNA, které jsou komplementární k jakékoliv izolované nukleové kyselině**
- **vyhledávání sekvencí v genových knihovnách**
- **vyhledávání sekvencí v cytologických preparátech**
- **charakterizace sekvencí**
- **mapování genomu**
- **při polymerázové řetězové reakci**

# *Typy hybridizací*

- hybridizace v roztoku
- hybridizace na pevném povrchu
- hybridizace *in situ* (FISH) – mapování chromozómů a specifických lokusů
- DNA, RNA arrays

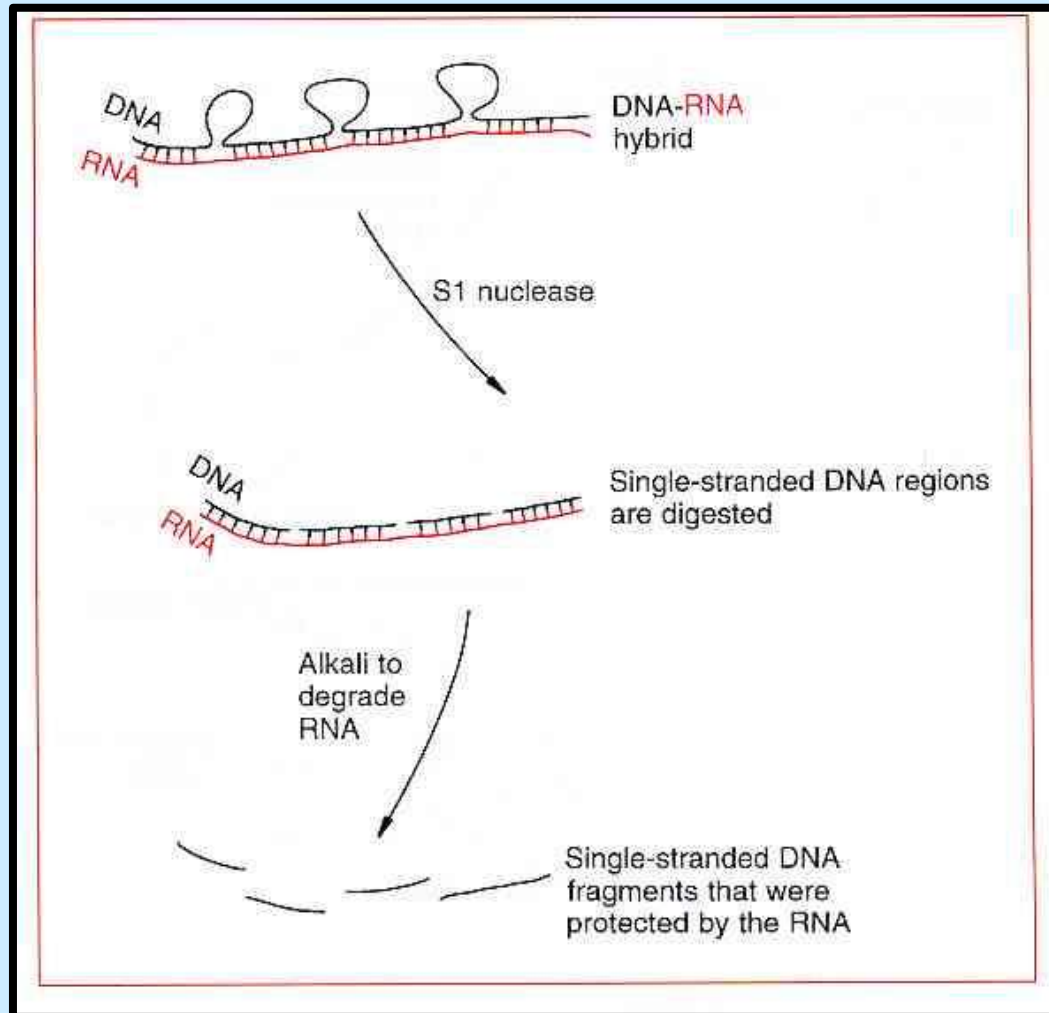
# *Hybridizace v roztoku*

**Samotná se téměř nevyužívá, většinou spojená s další detekční technikou**

- **S1 mapování (detekce exonů a intronů hybridu DNA/mRNA)**
- **Denaturační gradiendová gelová elektroforéza (DGGE)**
- **Heteroduplexní analýza**

# S1 mapování

Význam pro mapování složených genů





## Mají bakterie složené geny?

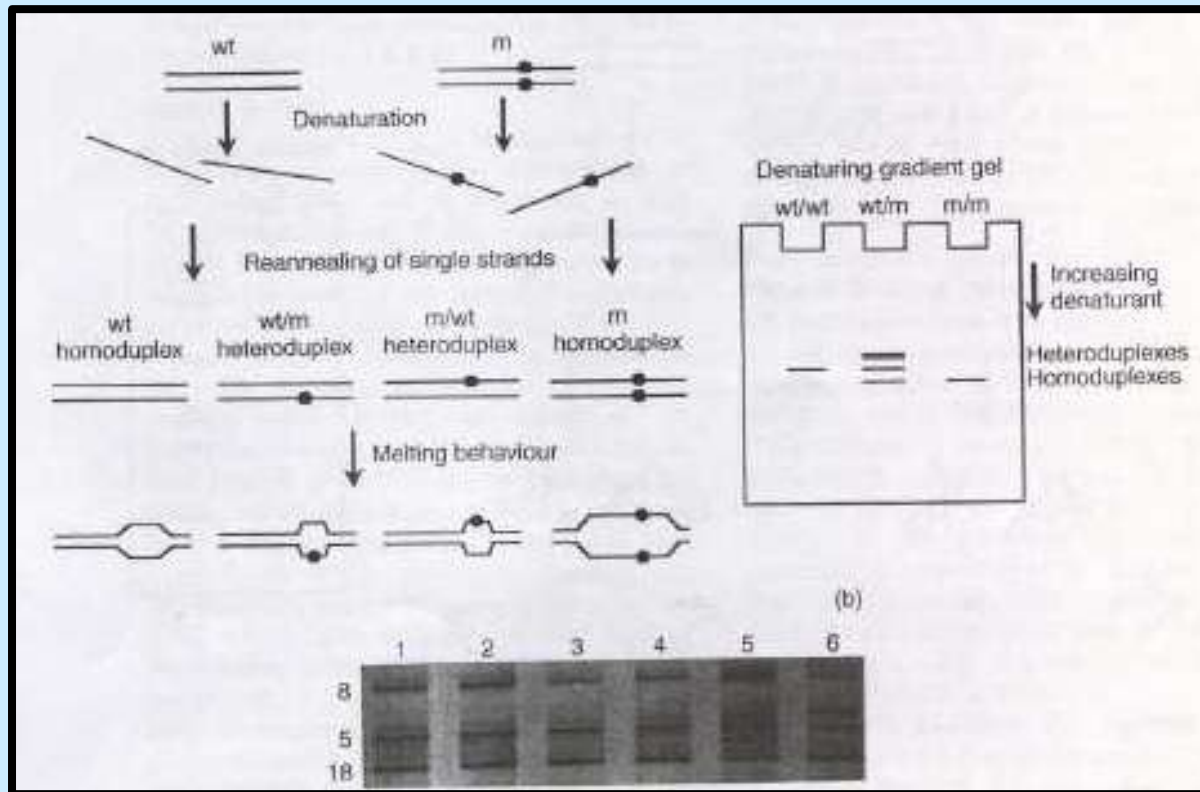
**Nemůžu žádný příklad najít.**

**Ale naše přednáška je o mikroorganismech, nejen o bakteriích. A kvasinky složené geny mají!**



# DGGE

- Páry CG drží více pohromadě než páry TA



Podobně funguje TGGE



# *Analýza heteroduplexů*

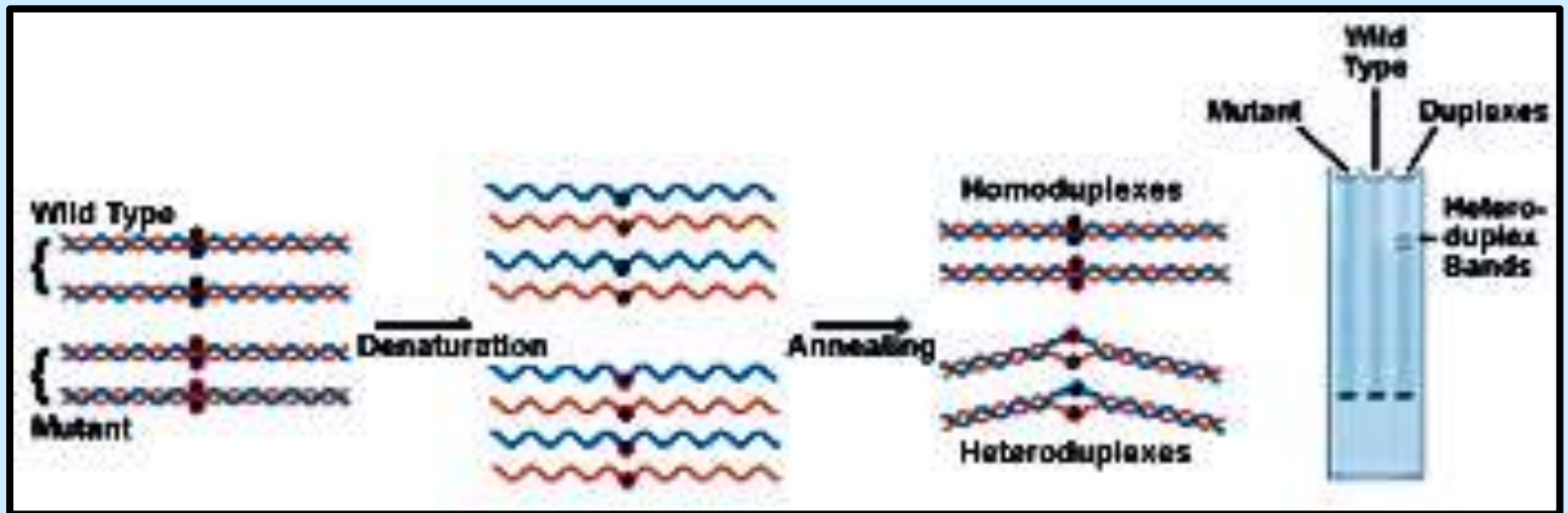
- Molekuly dsDNA vznikají z řetězců, které pocházejí z různých zdrojů
- Výsledné struktury nejsou 100% komplementární, z toho plyne označení heteroduplex
- Obsahují smyčky a bubliny v oblastech, kde se sekvence DNA liší
- Struktury lze pozorovat mikroskopicky – heteroduplexní mapování



**Podívejte se na heteroduplexní mapování v základní učebnici**

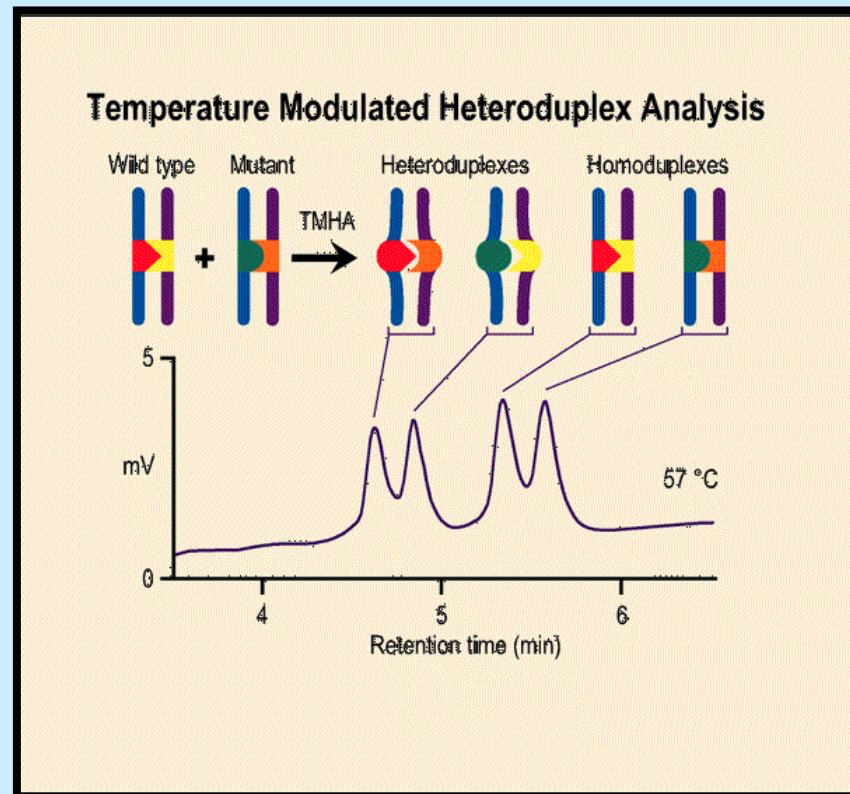
# *Analýza heteroduplexů*

Heteroduplexy se pohybují pomaleji než homoduplexy



# *Analýza heteroduplexů*

Homoduplexy a heteroduplexy lze rozlišit i kapilární elektroforézou



# *Hybridizace na pevném povrchu*

- Probíhá na speciální membráně
- Vzorek se nanáší přímo na membránu = **tečková hybridizace (dot blot)**
- Vzorek se rozdělí na gelu a pak se přenese na membránu = **Southernův přenos (Southern blot)**
- Základem hybridizace je obvykle **značená sonda** o známé nukleotidové sekvenci

# ***Blotting = přenos***

- **Southern blotting (Dr. Edwin Southern) = DNA**
- **Northern blotting = RNA**
- **Western blotting = proteiny**
  
- **southwesternový přenos - proteiny vázající se na DNA (sondou je DNA)**
- **northwesternový přenos - proteiny vázající se na RNA (sondou je RNA)**

# ***K čemu se využívá Southernův přenos***

- **Identifikace přítomnosti genu v materiálu vůbec**
- **Identifikace genu za účelem jeho klonování**
- **Využívá se tam, kde je dostupné pouze malé množství vstupního materiálu nebo je vysoké pozadí**

# ***Příprava hybridizačních sond***

## **Sondy radioaktivně značené**

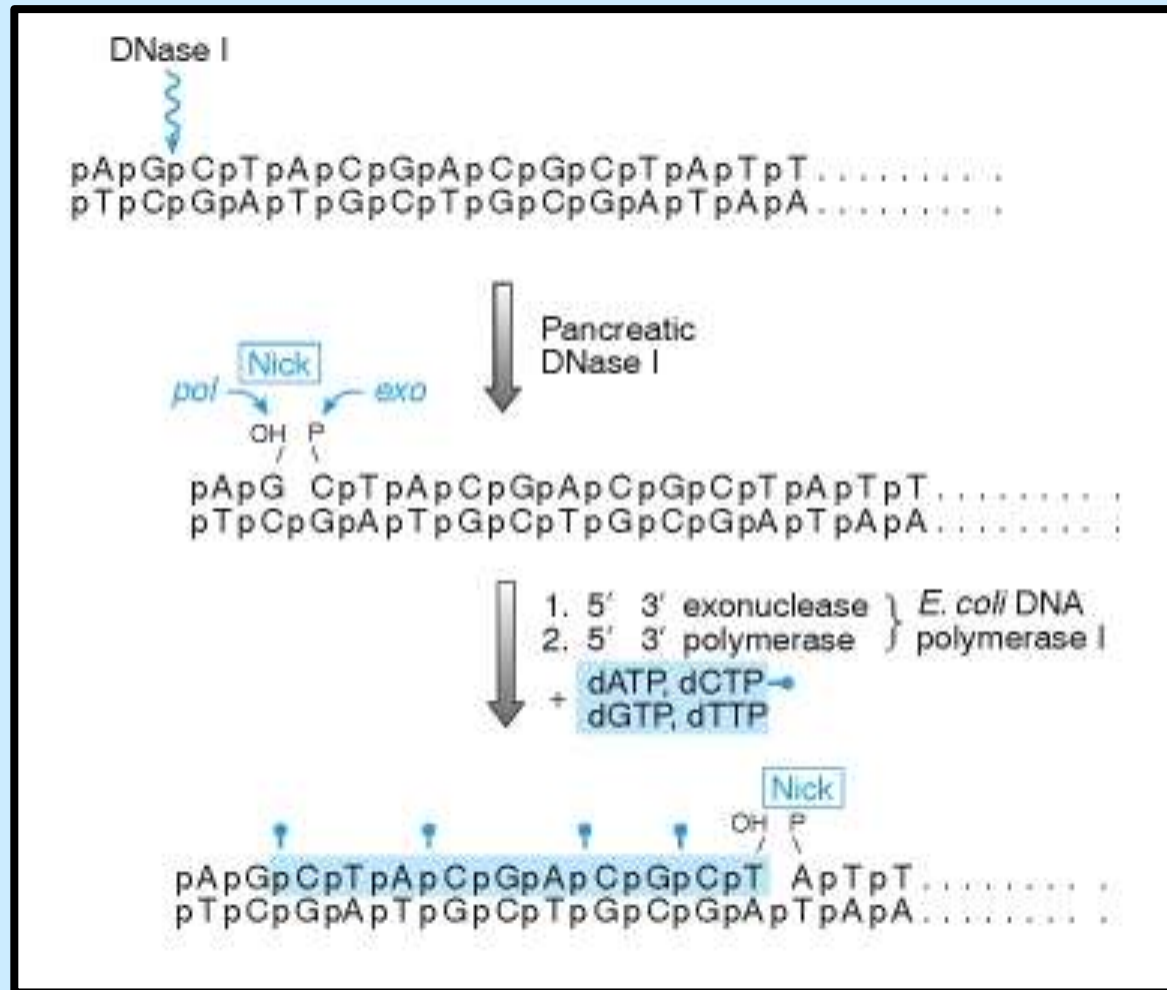
- **Nick translace**
- **Vyplnění jednořetězcových konců**
- **Nahodilé značení**
- **Zpravidla se využívá radioaktivní fosfor  $^{32}\text{P}$**

## **Sondy fluorescenčně značené**

- **Značení biotinem**
- **Značení digoxigeninem**
- **Značení křenovou peroxidázou**
- **Citlivější, bezpečnější, dnes už používané častěji**

# Nick translation

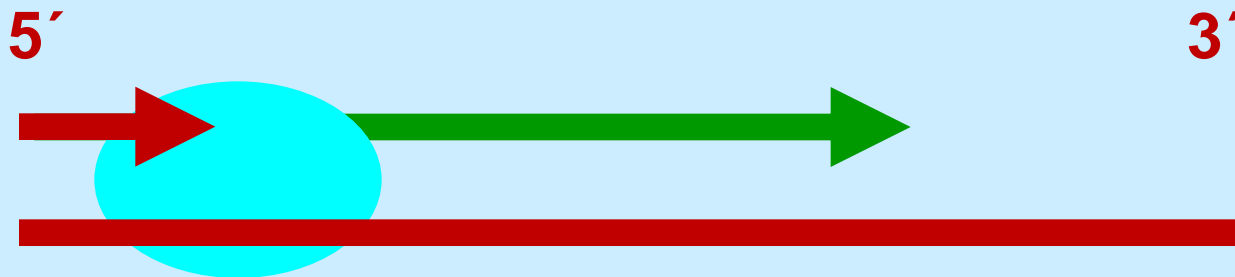
## Posun jednořetězcového zlomu



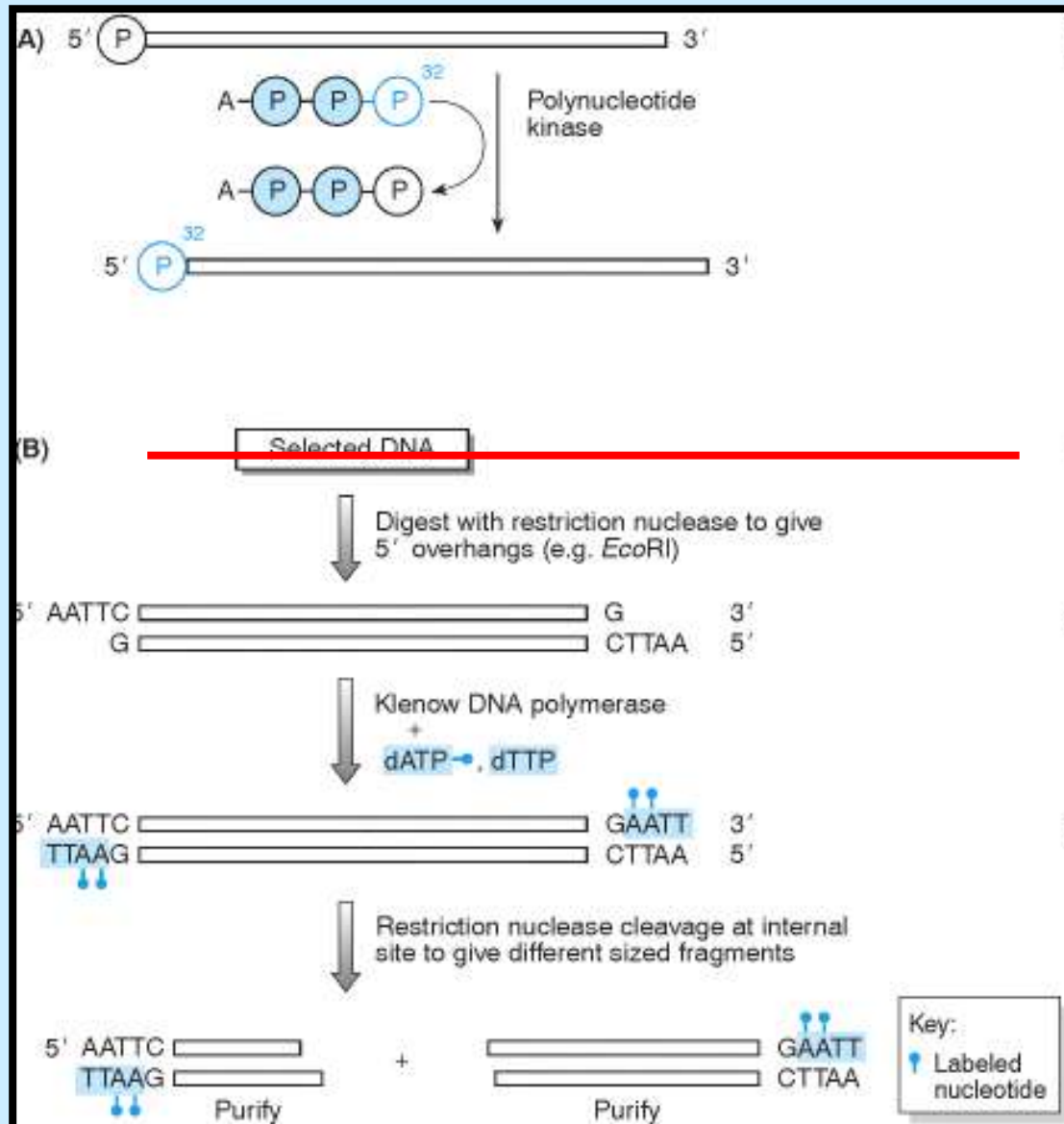


# *Zopakujme si: Klenowův fragment*

- syntéza ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'
- tam, kde se neodbourává primer
- sekvenování, značení DNA

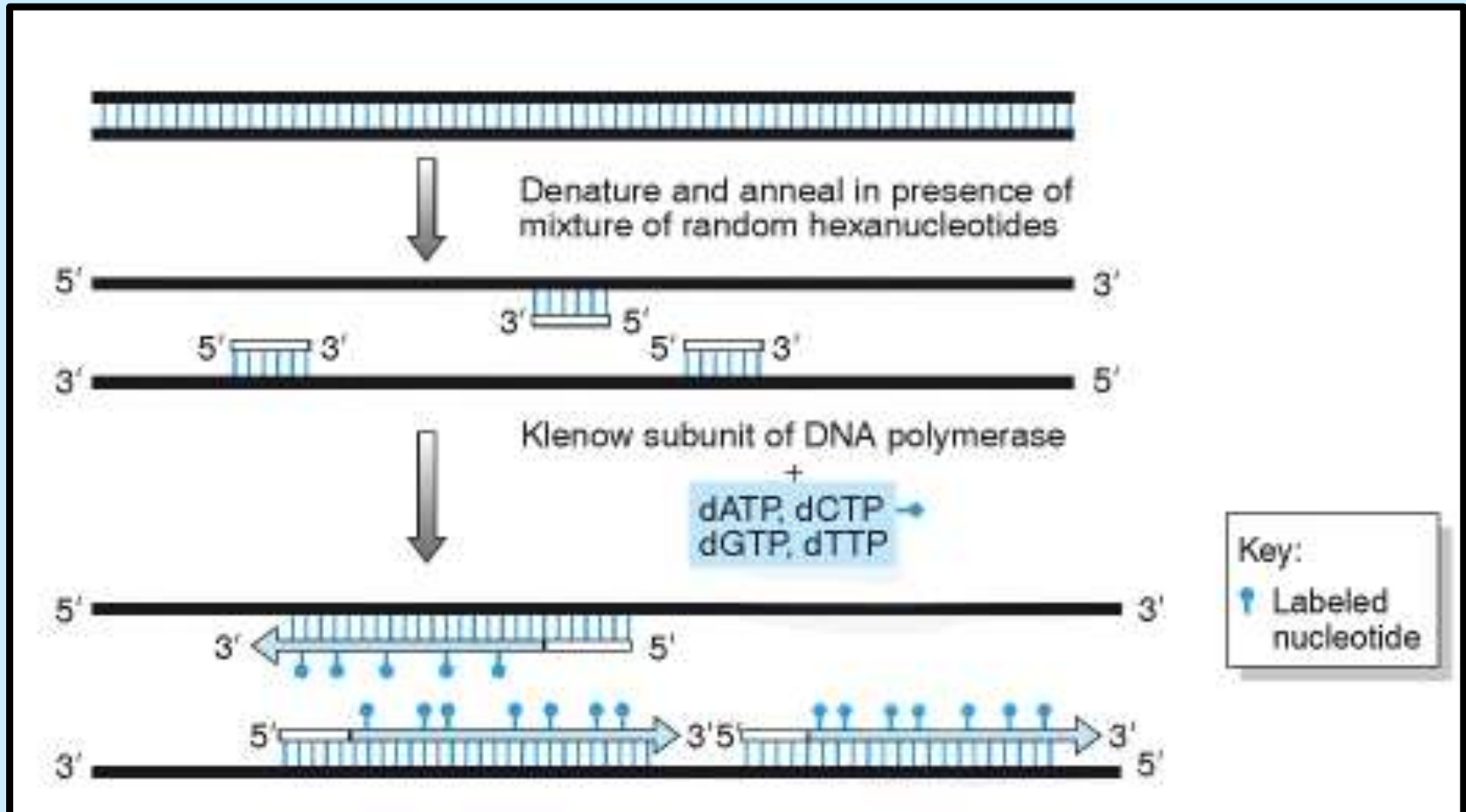


# Značení konců nukleových kyselin



# Nahodilé značení

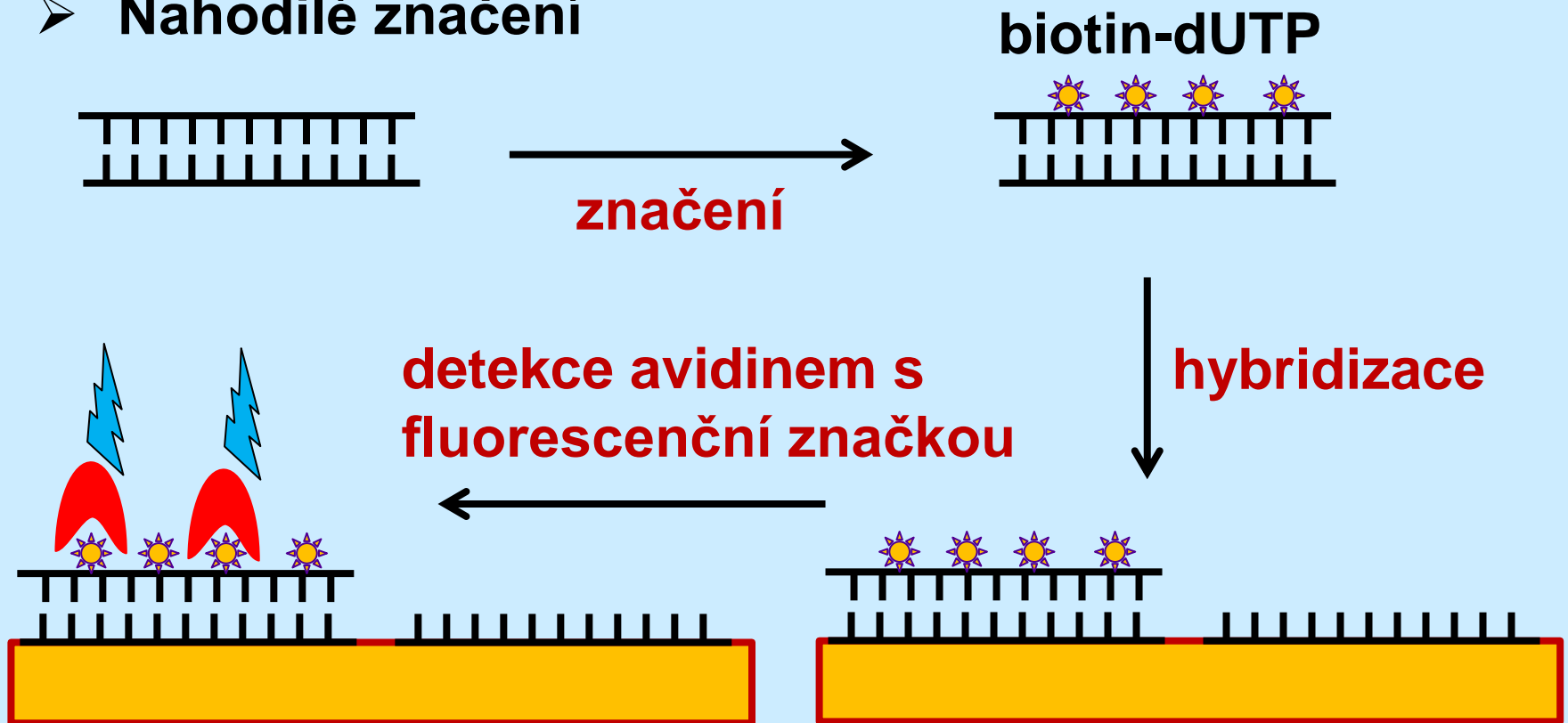
„random primer DNA labeling“ = prostřednictvím náhodných hexanukleotidů



# Značení biotinem

Lze využít všech tří základních postupů

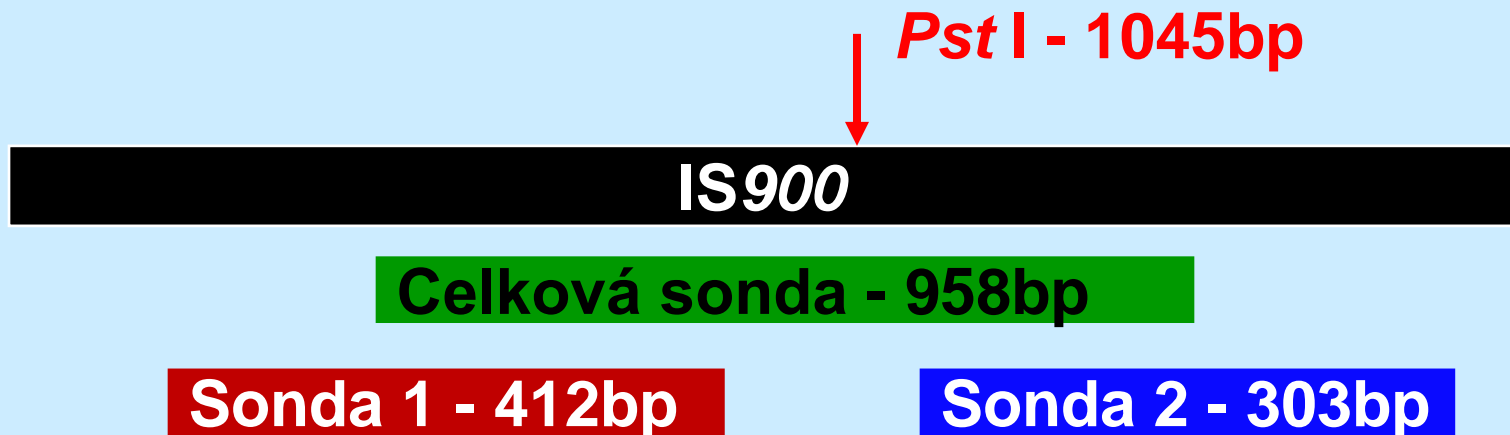
- Nick translace
- Vyplnění jednořetězcových konců
- Nahodilé značení



# ***Praktická aplikace značení sond***

# ***Příprava sond pro diferenciaci kmenů *M. a. paratuberculosis****

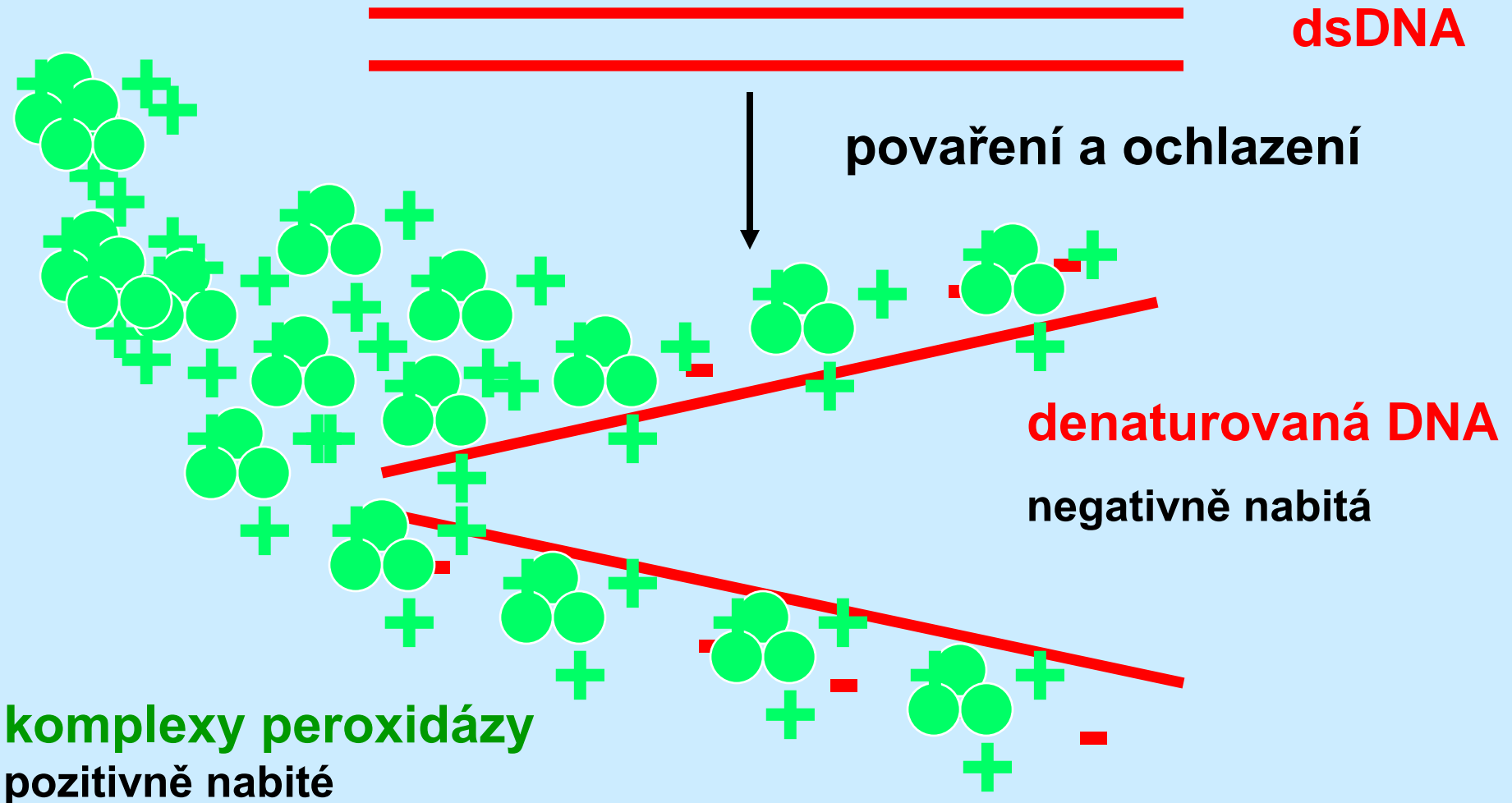
**Celkem 3 sondy detekující části inzerční sekvence IS900 – inzerční sekvence specifické pro *M. a. paratuberculosis***



# ***Základní kroky při přípravě sond***

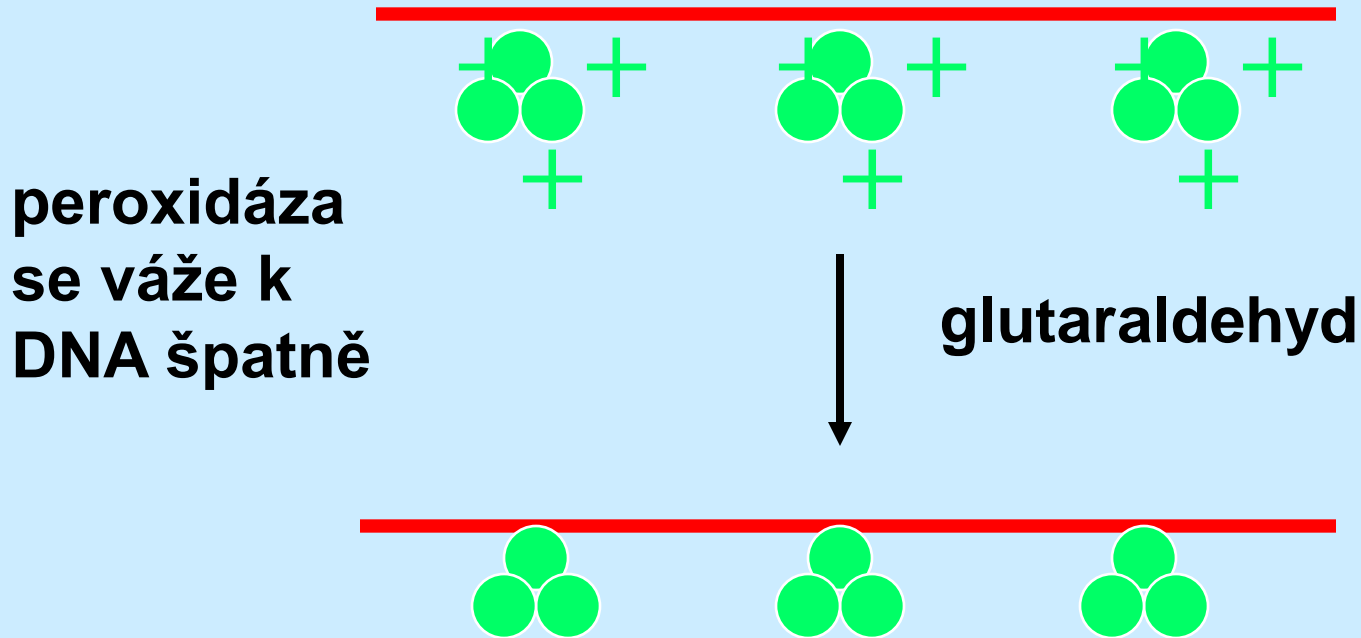
- **Amplifikace specifických fragmentů PCR**
- **Purifikace amplikonů**
- **Značení sond peroxidázou**
- **Kontrola koncentrace sondy**

# Značení sondy





# Značení sondy

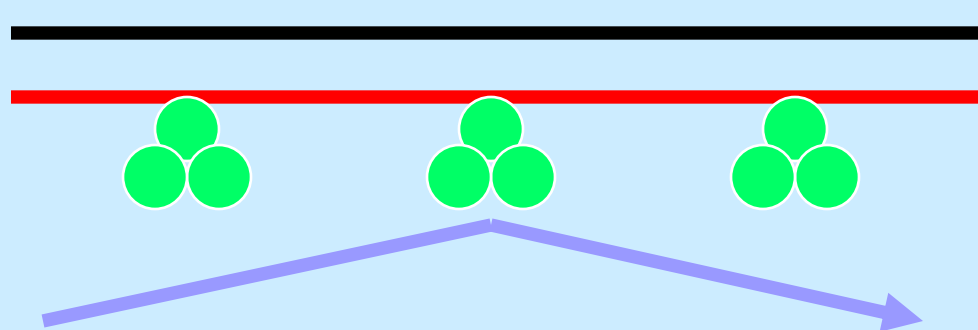


peroxidáza  
se váže k  
DNA špatně

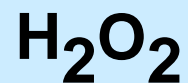
glutaraldehyd

peroxidáza se váže k DNA kovalentně

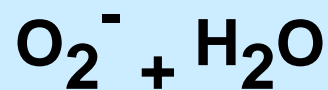
# Detekce peroxidázou značené sondy



matricová DNA  
značená sonda



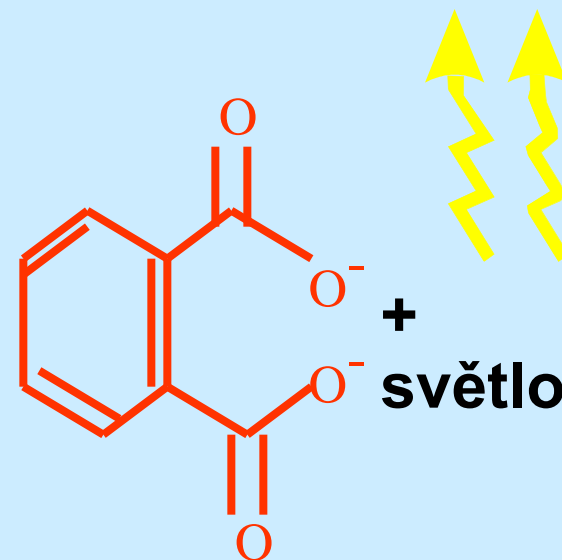
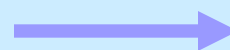
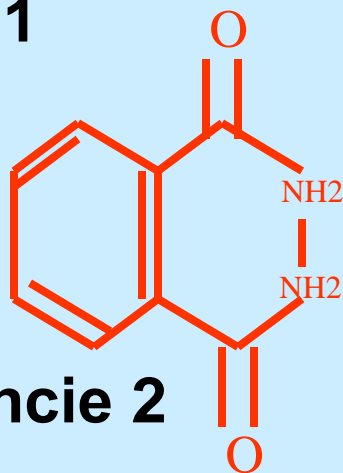
detekční reagensie 1



zesilovač

luminol

detekční reagensie 2

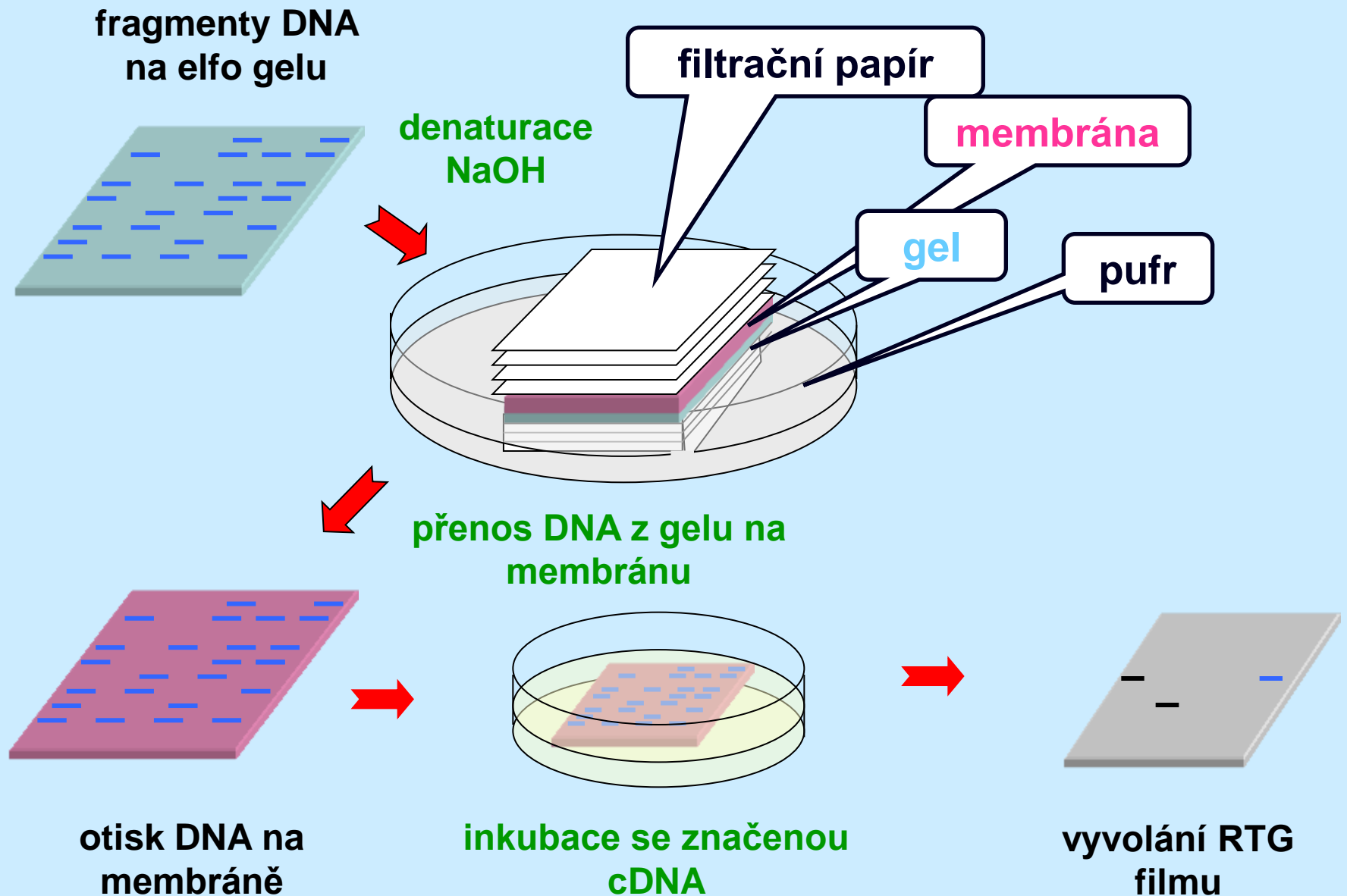


+ světlo

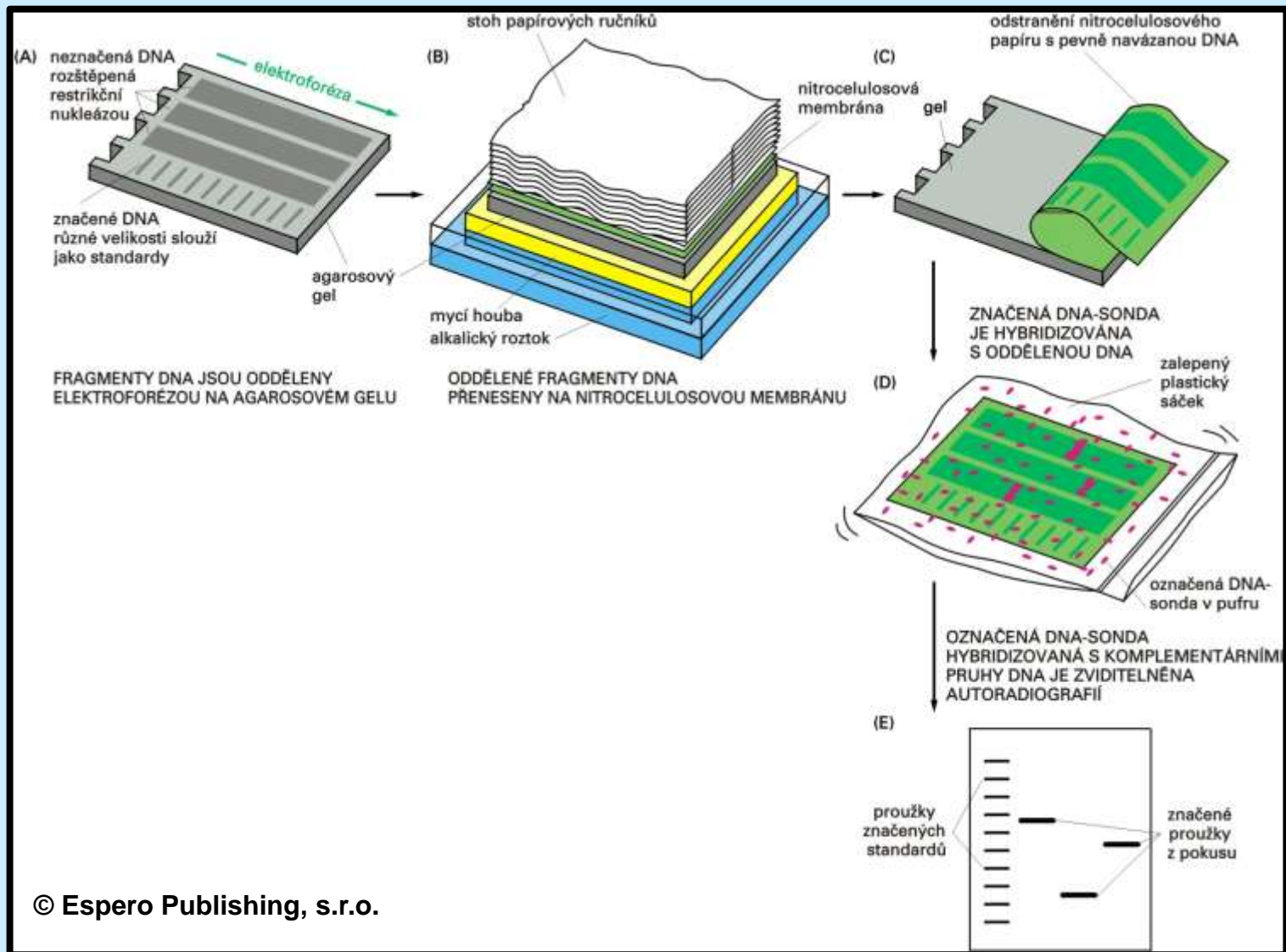
# *Postup při Southernově přenosu*

- 1. rozdělení fragmentů DNA** daného vzorku gelovou elektroforézou
- 2. denaturace DNA a přenos** jednořetězcových fragmentů DNA **na** nylonový **filtr** („blotting“)
- 3. inkubace filtru se značenou** jednořetězcovou **sondou**: hybridizace sondy s komplementární sekvencí imobilizovanou filtru
- 4. odmytí** nenavázané sondy
- 5. detekce** navázané **sondy** - vizualizace hybridů

# Southern blotting



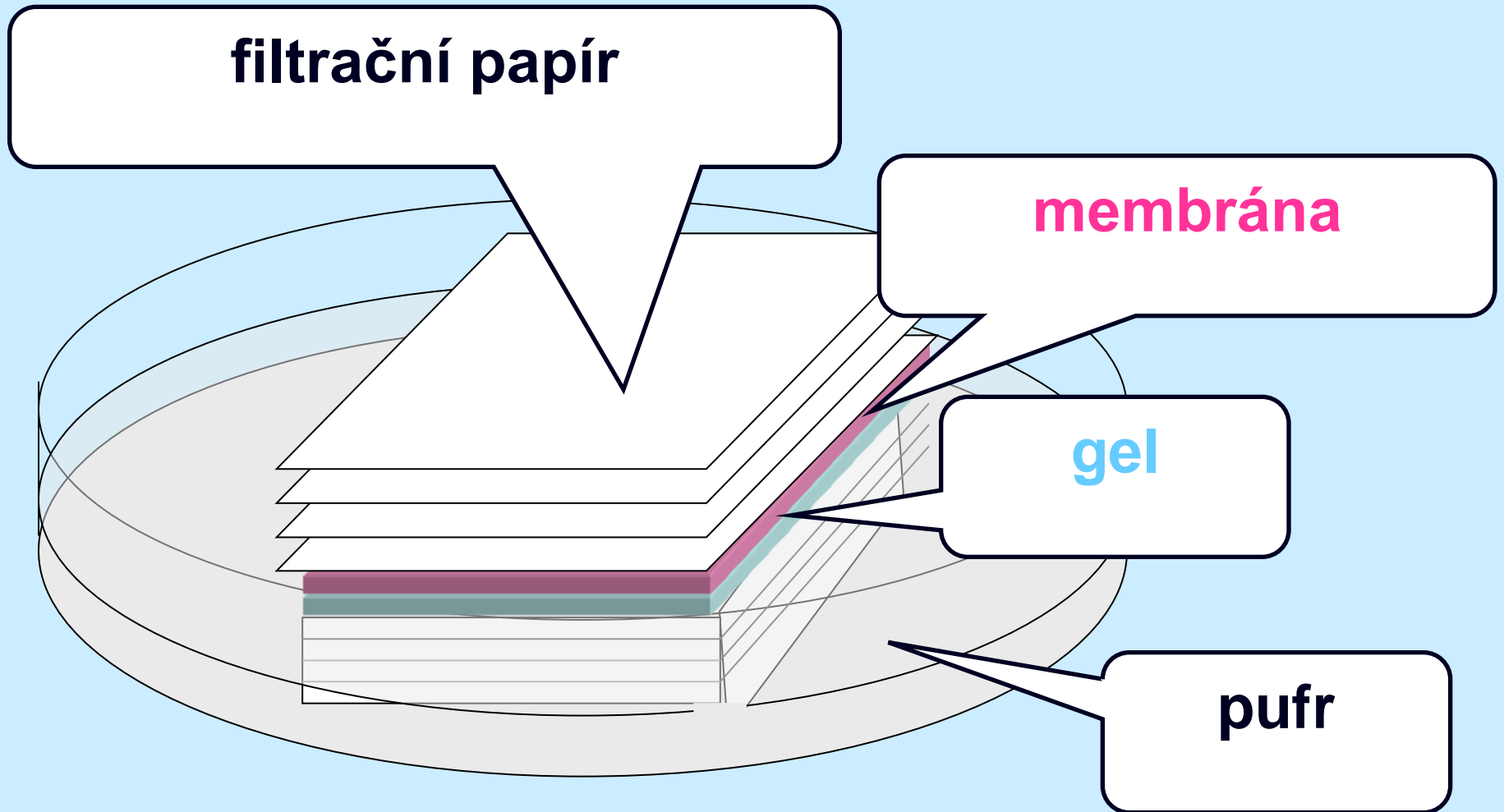
# Southern blotting



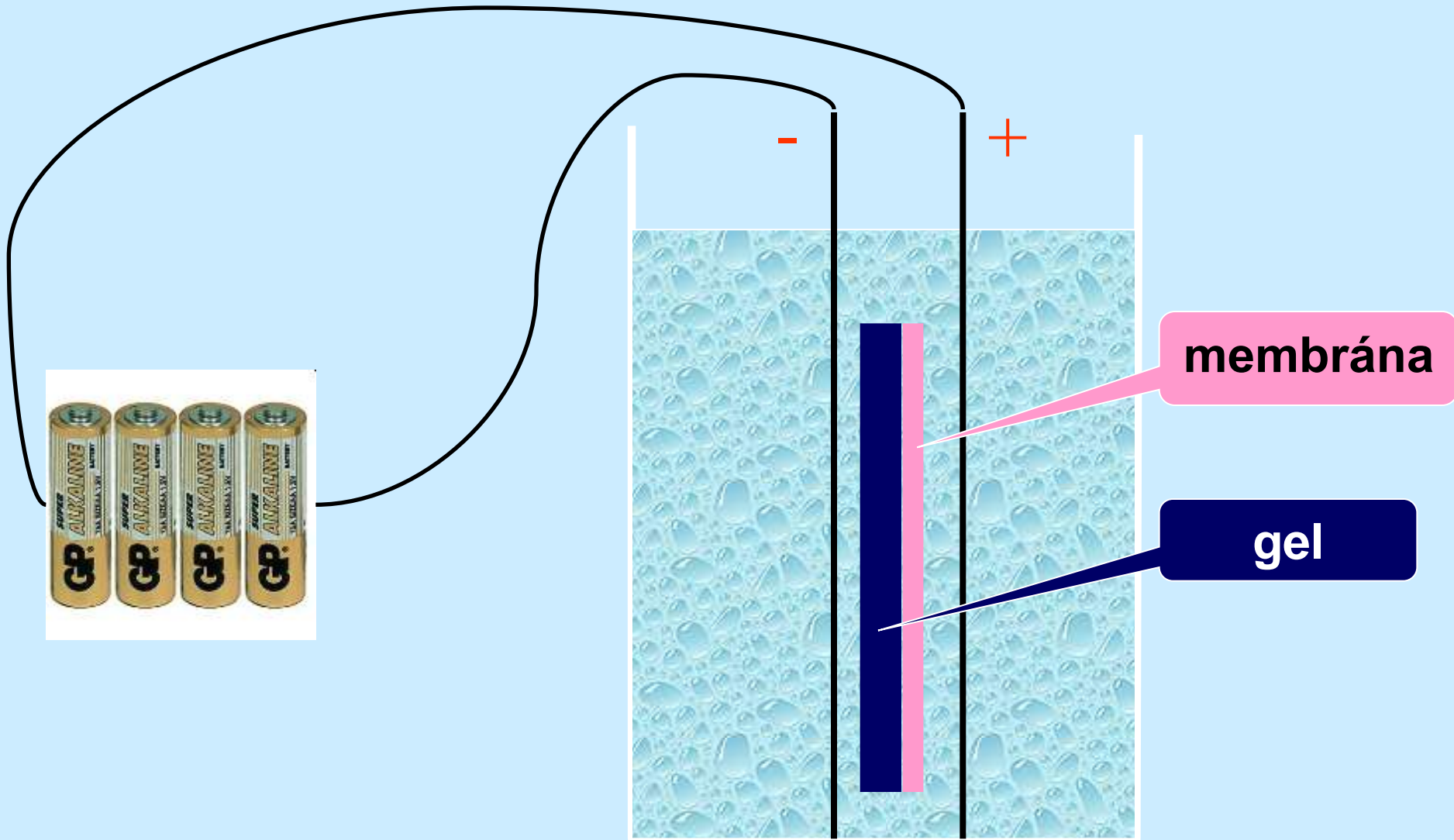
# ***Způsoby přenosu („blottingu“)***

- **kapilární přenos**
- **elektroforetický přenos**
- **vakuový přenos**

# *Kapilární přenos*

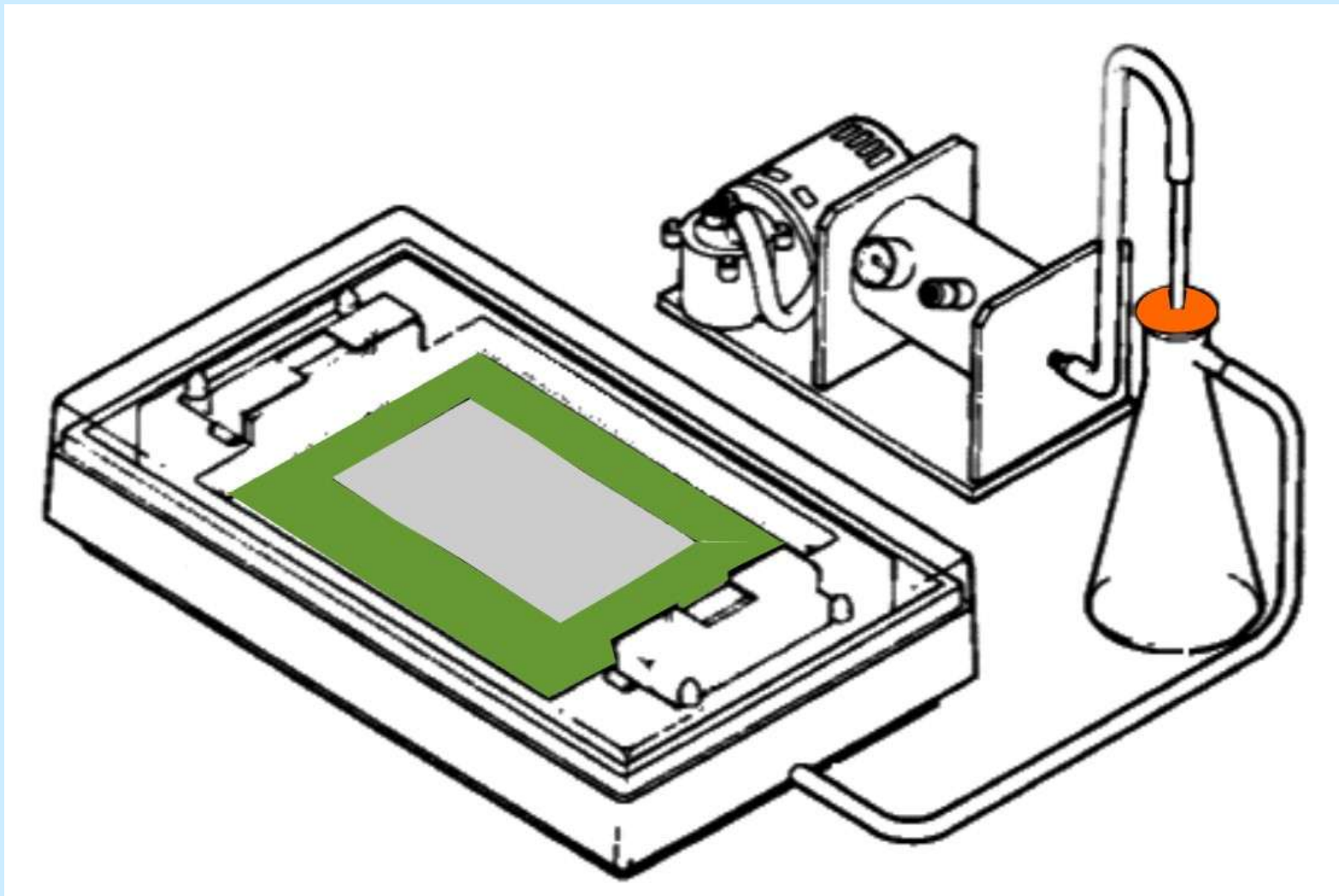


# *Elektroforetický přenos*





# *Vakuový přenos*



# ***Fluorescentní in situ hybridizace***

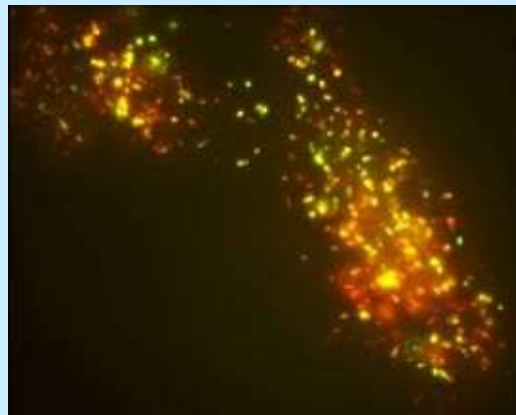
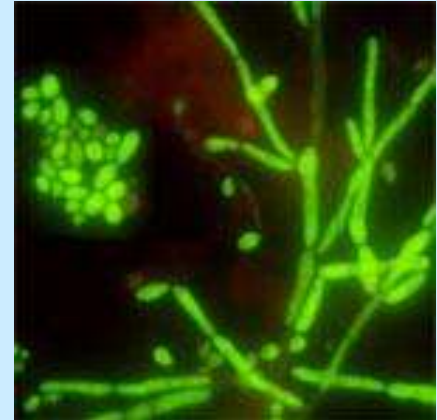
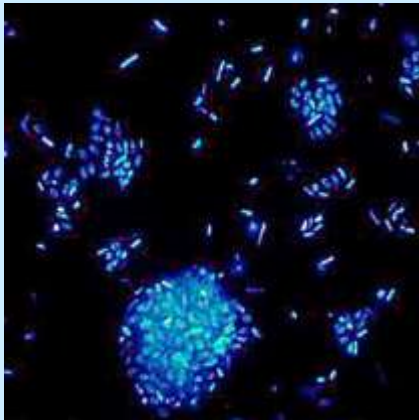
## **fluorescence *in situ* hybridization (FISH)**

**Metoda sestává ze tří základních kroků**

- **Fixace vzorku na mikroskopickém sklíčku**
- **Hybridizace značené sondy k homologickým fragmentům na genomové DNA**
- **Enzymatická detekce hybridů sonda-cílová sekvence**
- **Sondy radioaktivně značené**
- **Sondy fluorescenční: rychlejší, silnější signál, simultánní diferenciaci různých cílů**

# ***Ukázky FISH***

**fluorescence *in situ* hybridization**



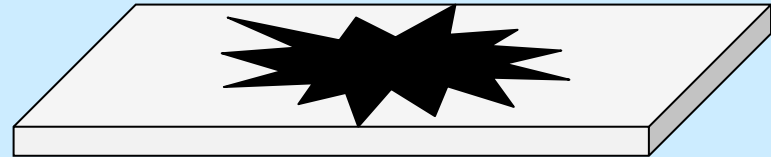
# ***FISH v mikrobiologii***

- **Umožňuje detekci i nerostoucích bakterií**
- **Sonda je druhově specifická a míří zpravidla ke genu pro 16S rRNA**
- **Metoda je vhodná pro fylogenetické, ekologické, diagnostické a environmentální studie**
- **Kombinuje preciznost molekulární biologie s mikroskopickým pozorováním**
- **Je možno pozorovat výskyt bakterií v kontextu s morfologickou charakteristikou napadené tkáně**
- **Citlivost až jediná bakterie, metodicky mimo PCR**

# Typický FISH protokol

## 4 základní kroky

1) Fixace a permeabilizace vzorku



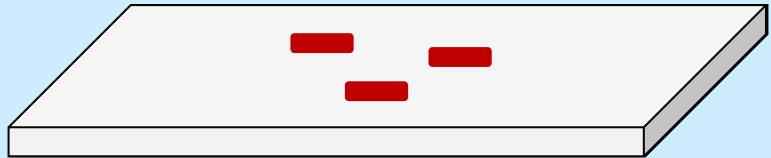
2) Hybridizace



3) Promývací kroky – odmytí nenavázané sondy



4) Detekce značených buněk mikroskopicky nebo průtokovou cytometrií



# *Charakteristika sond*

Dlouhé 15 až 30 nukleotidů

<b>Fluorofor</b>	<b>Barva</b>	<b>Excitace</b>	<b>Emise</b>
<b>Alexa 488</b>	<b>zelená</b>	<b>493</b>	<b>517</b>
<b>Cy3</b>	<b>červená</b>	<b>552</b>	<b>565</b>
<b>Cy5</b>	<b>červená</b>	<b>649</b>	<b>670</b>
<b>DAPI</b>	<b>modrá</b>	<b>350</b>	<b>456</b>
<b>Fluorescein</b>	<b>zelená</b>	<b>494</b>	<b>523</b>
<b>Rodamin</b>	<b>červená</b>	<b>555</b>	<b>580</b>
<b>TAMRA</b>	<b>červená</b>	<b>543</b>	<b>575</b>
<b>Texas red</b>	<b>červená</b>	<b>590</b>	<b>615</b>

# Zodpovězte otázku



Jak dlouhá musí být minimálně sonda, aby našla jedinou specifickou sekvenci v bakterii, jejíž genom má velikost  $4,0 \times 10^6$  bp?

$$4,0 \times 10^6 = 4^x$$

$$\ln(4,0 \times 10^6) = X \ln(4)$$

$$X = \ln(4,0 \times 10^6) / \ln(4)$$

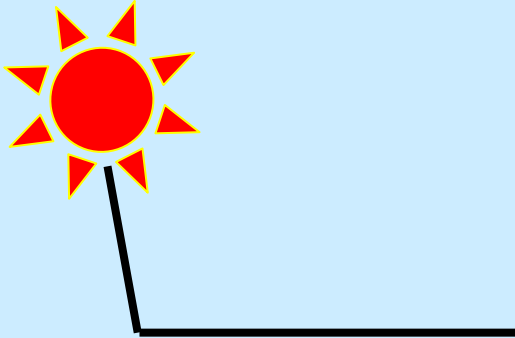
$$X = 11$$



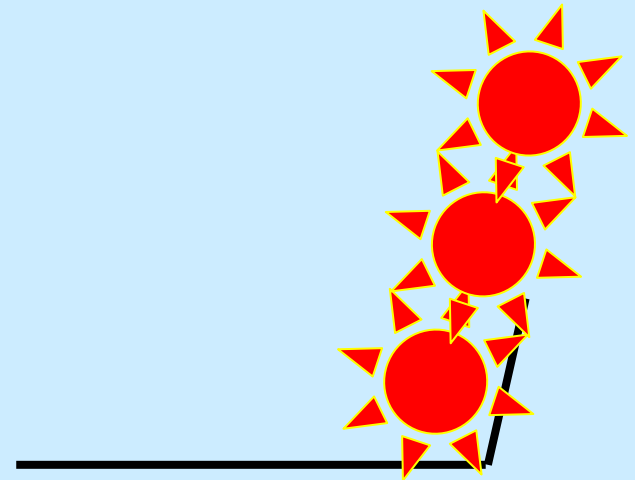
# *Jak označit sondu?*

## Přímé značení

**5' - koncové značení**



**3' - koncové značení**

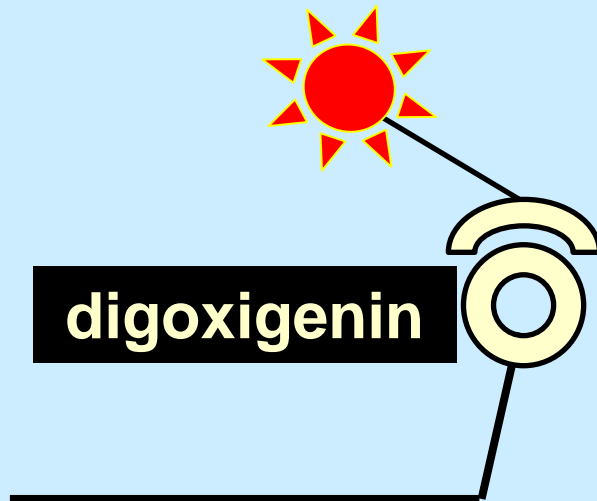




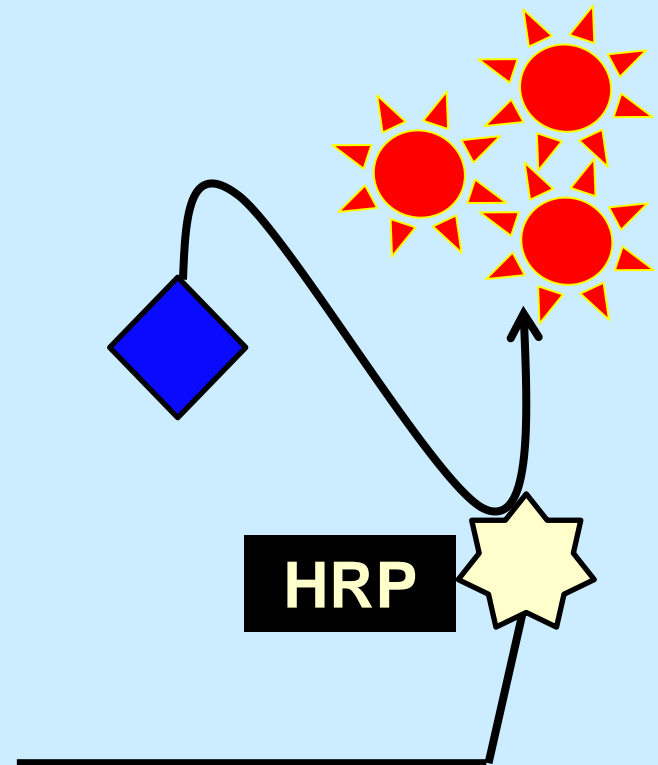
# *Jak označit sondu?*

## Nepřímé značení

Reportérová molekula

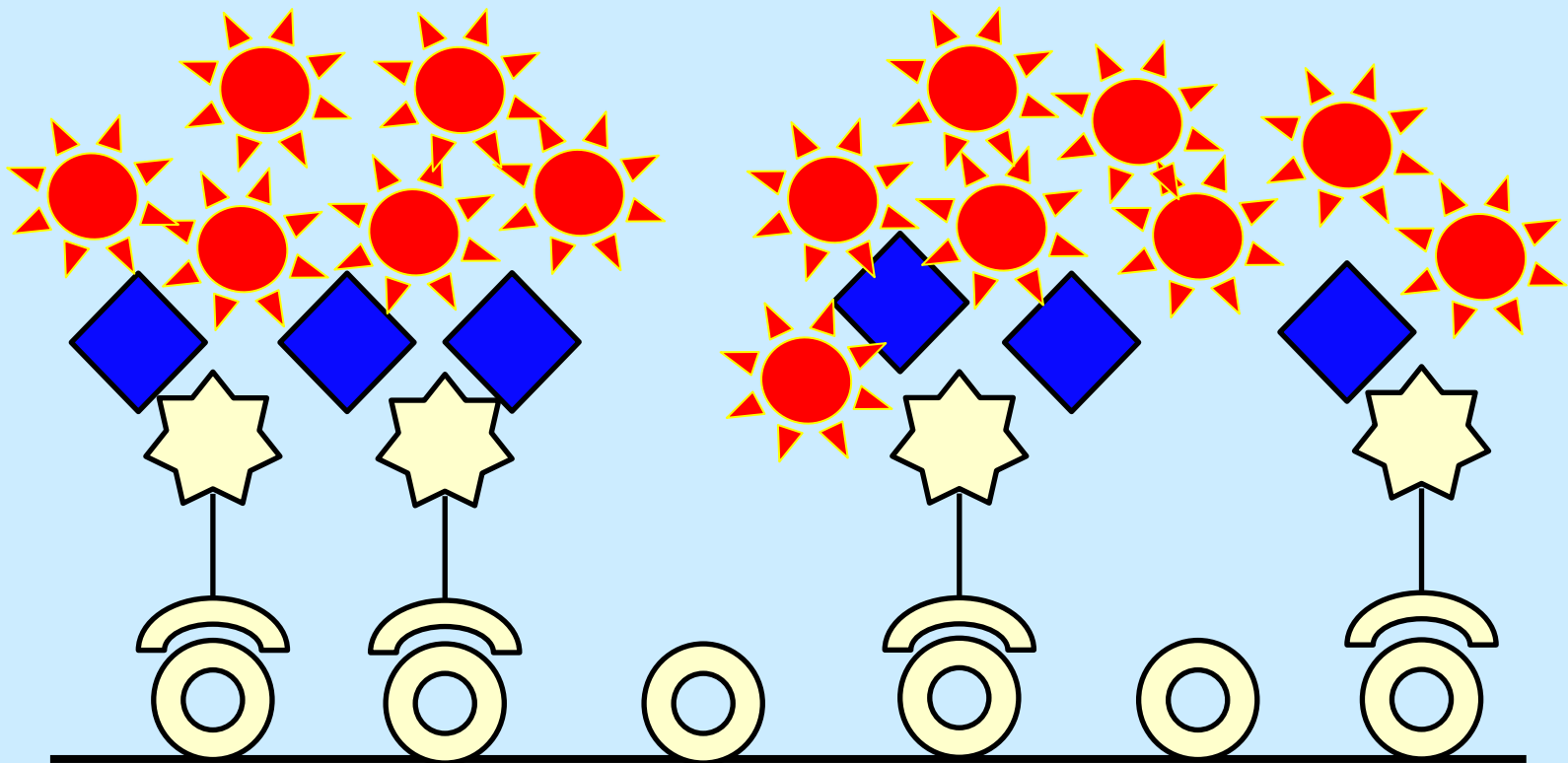


Značení enzymem



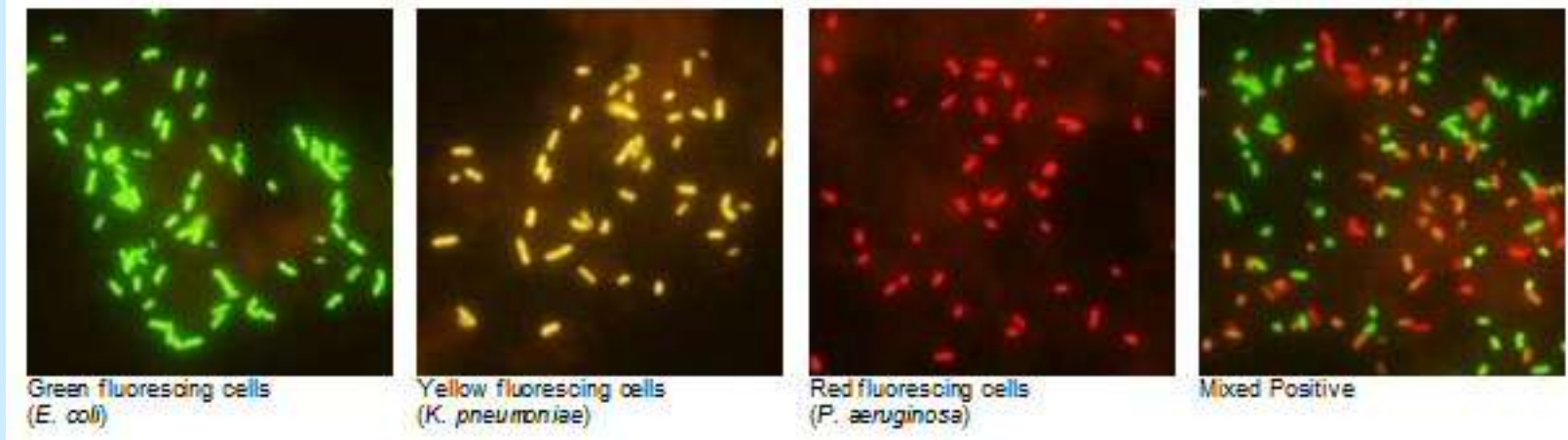
# ***Jak označit sondu?***

**Nepřímé značení – polyribonukleová sonda**



# *Dvě hlavní oblasti využití FISH v mikrobiologii*

- **Analýza vzorků potravin**
- **Studium biofilmů**



# *Varianty FISH*

- ACM-FISH
- armFISH
- CARD-FISH
- catFISH
- CB-FISH
- CO-FISH
- COBRA-FISH
- COD-FISH
- COMBO-FISH
- Comet-FISH
- Cryo-FISH
- D-FISH
- DBD-FISH
- e-FISH
- Fiber-FISH
- Flow-FISH
- Fusion-Signal FISH
- Halo-FISH
- Harlequin-FISH
- Immuno-FISH
- LNA-FISH
- M-FISH
- ML-FISH
- PCC-FISH
- PNA-FISH
- Q-FISH
- QD-FISH
- Rainbow-FISH
- Raman-FISH
- ReD-FISH
- Reverse-FISH
- RING-FISH
- RNA-FISH
- RxFISH
- Split-Signal FISH
- T-FISH
- 3-D FISH
- Zoo-FISH

# *Další čtení*



**Bottari B (2006): Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. Appl Microbiol Biotechnol (2006) 73:485–494**

**<http://www.nottingham.ac.uk/biosciences/divisions/food/research/projects/foodmicrobiology.aspx>**

**<http://www.rapidmicrobiology.com/news/1431h22.php>**

# ***Vybrané aplikace hybridizačních technik v mikrobiologii***

- **Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)**
- **Ribotypizace**
- **Metoda reverzní hybridizace**
- **Metoda spoligotypizace**

***A více se dozvíte v  
5. ročníku***



# ***Shrnutí***

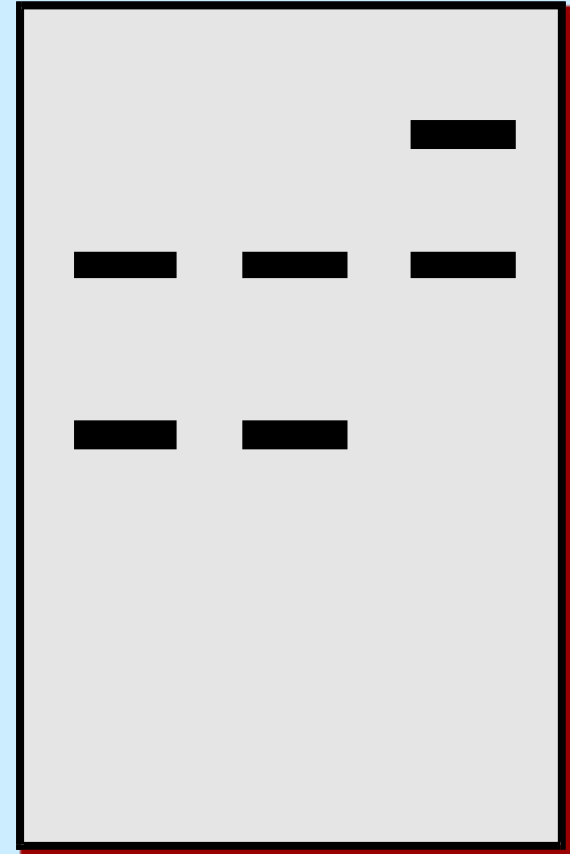
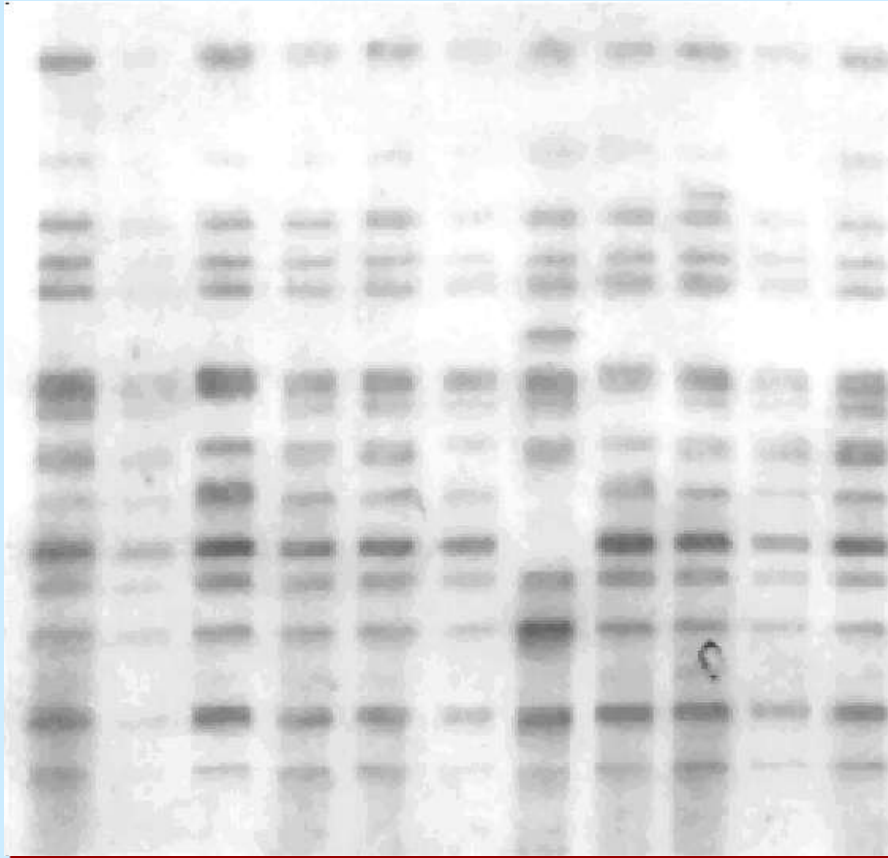
- 1) Způsoby provedení hybridizace**
- 2) Hybridizace v roztoku**
- 3) Příprava značených sond**
- 4) Hybridizace na pevném povrchu**
- 5) Southernův přenos**
- 6) Fluorescentní *in situ* hybridizace**



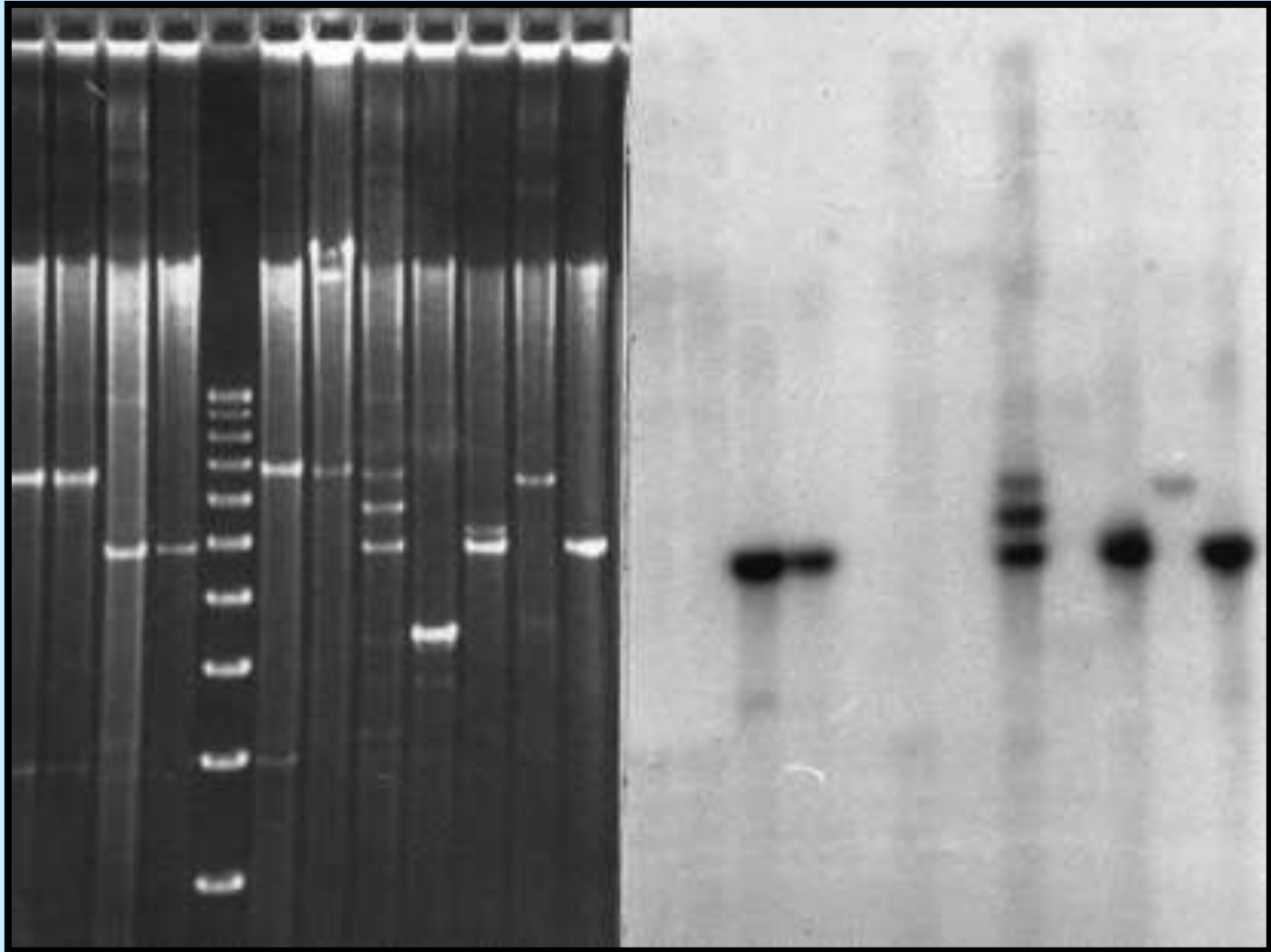
# *Metoda RFLP*

- Restrikční fragmenty rozdělené na gelové elektroforéze
- Detekce vybraných polymorfních úseků značenou sondou
- Rozdíly ve spektru jsou dány ztrátou nebo získáním restrikčního místa, delecí nebo inzercí
- Jsou možné i změny v počtu repetitivních sekvencí nebo translokace
- Sondy z náhodně vybraných sekvencí
- Sondy ze specifických esenciálních genů nebo genů pro faktory virulence
- Sondy z IS, transpozonů a repetitivních sekvencí
- Sondy z genů pro rRNA

# *Zjednodušený princip RFLP*



# *Porovnání elektroforézy a hybridizace*

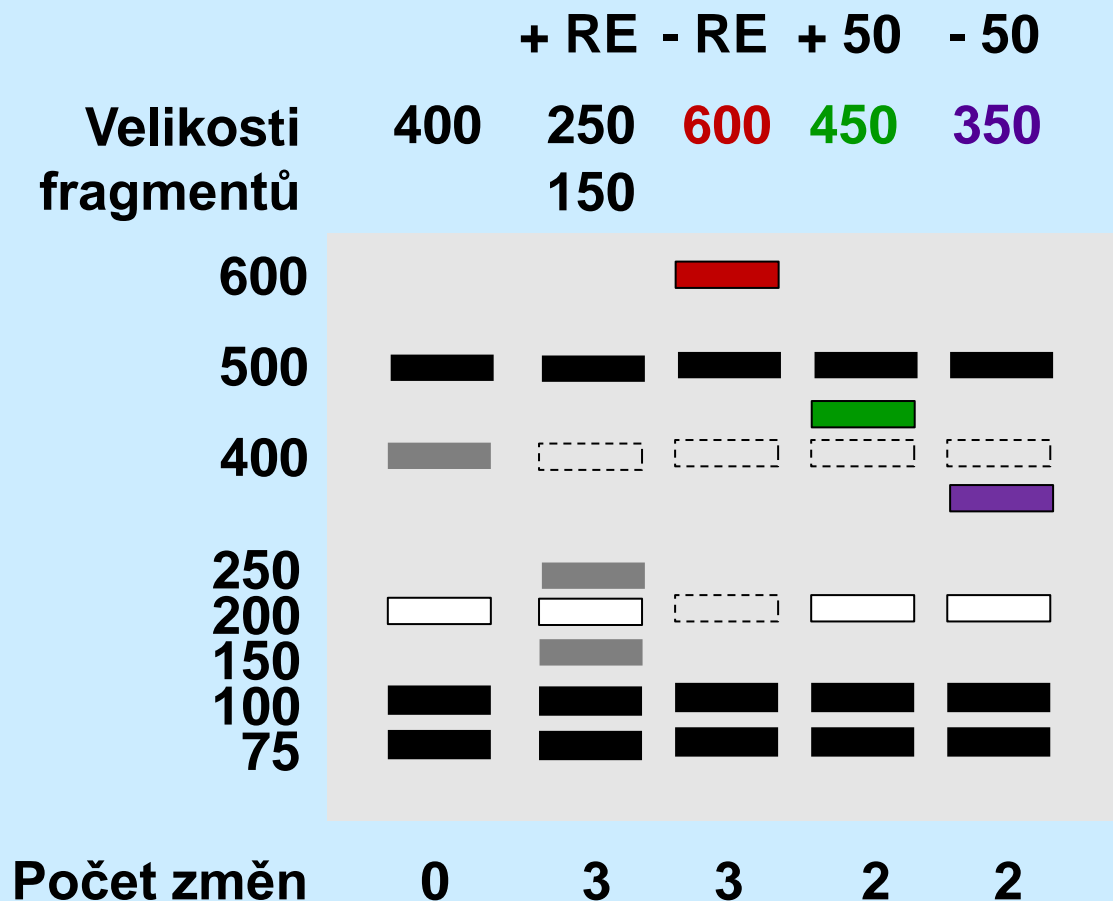


**DNA obarvená  
ethidium bromidem**

**autoradiogram**

# Naznačení analýzy RFLP profilu

Analýza změn ve fragmentu 400 bp

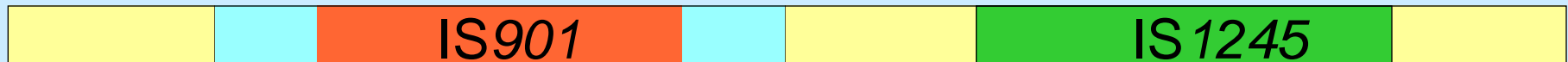


# ***Využití RFLP v epidemiologii původců mykobakterióz***

- **Epidemiologie paratuberkulózy, IS900**
- **Epidemiologie aviární tuberkulózy**
- **Analýza kmenů *MAC* v rámci jednoho chovu**
- **Analýza kmenů *MAA IS901* u jedince**
- **Analýza smíšených infekcí kmenů *MAC***

# ***Inzerční sekvence u vybraných mykobakterií***

***M. avium subsp. avium*** serotypy 1-3, ***M. avium subsp. silvaticum***



***M. avium subsp. hominissuis*** serotypy 4-6, 8-11 a 21



FR300bp

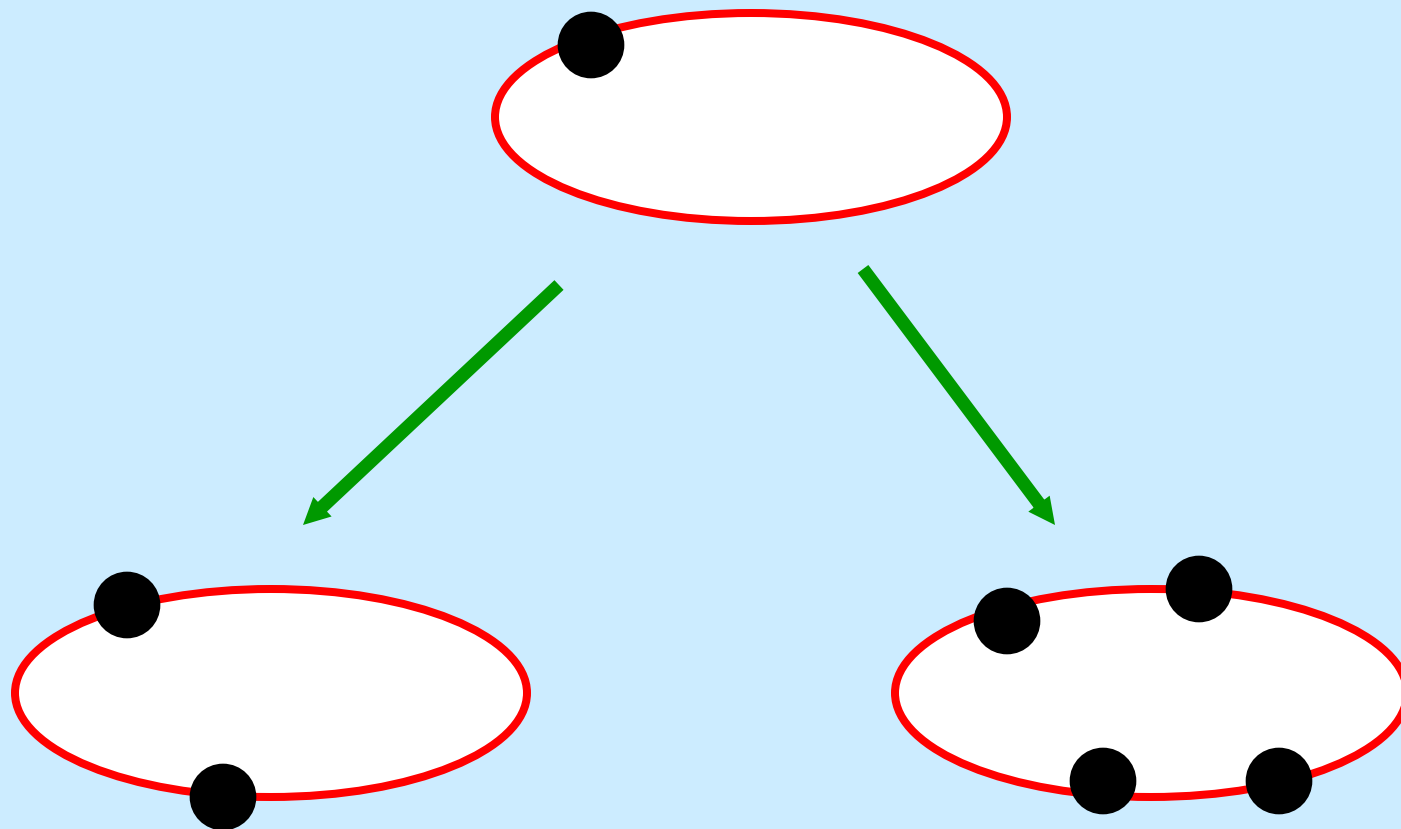
***M. avium subsp. paratuberculosis***



***M. intracellulare*** serotypy 7, 12-20, 22-28



# *Inzerční sekvence transponují*

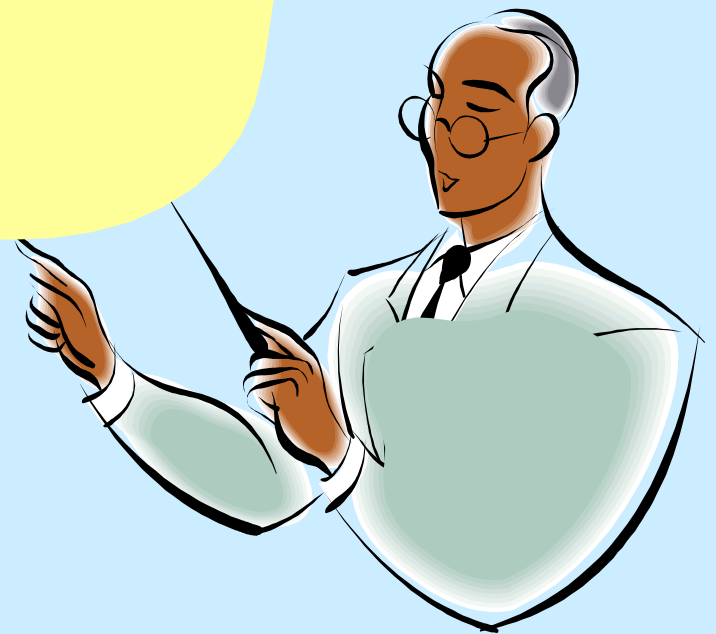


- **Kopie IS se chovají jako bodové mutace**
- **Důsledkem transpozice jsou různé RFLP profily**

**Pro studium epidemiologie**

***MAA* je vhodná *IS901***

**Pro *MAP* potom *IS900***





# ***RFLP profily na bázi IS901 - MAA***

## ***Pvull - IS901 RFLP profily***

- **25 vícekopiových profilů**
- **3 profily o malém počtu kopií**
- **celkem 28 RFLP typů**

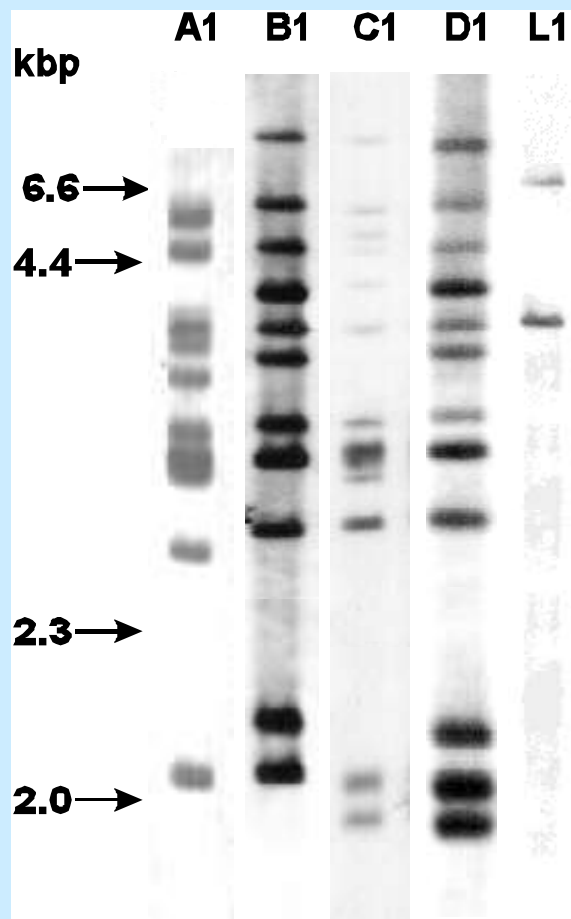
## ***Pstl - IS901 RFLP profily***

- **4 vícekopiové profily**
- **1 profil o malém počtu kopií**
- **celkem 25 RFLP typů**





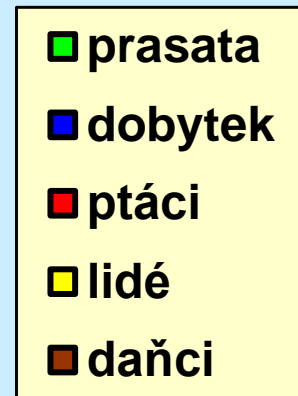
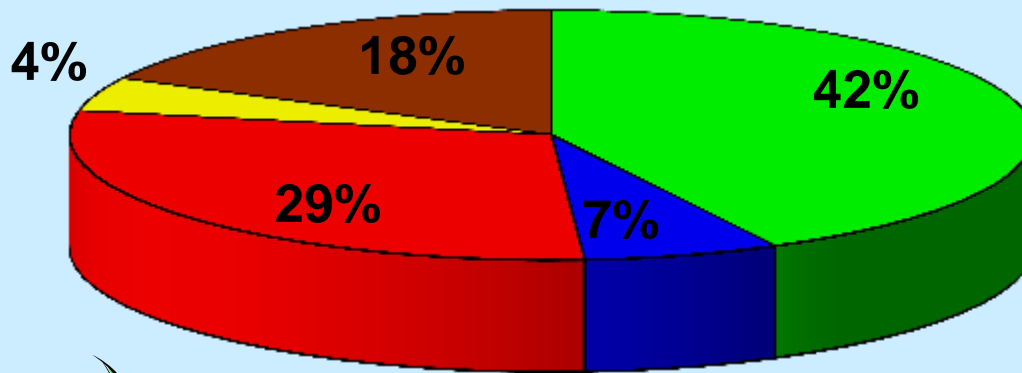
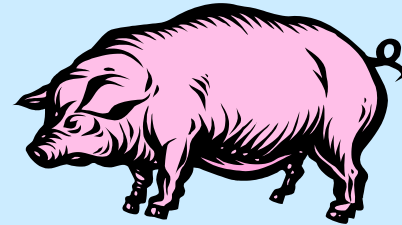
# *Vybrané PstI - IS901 RFLP profily*



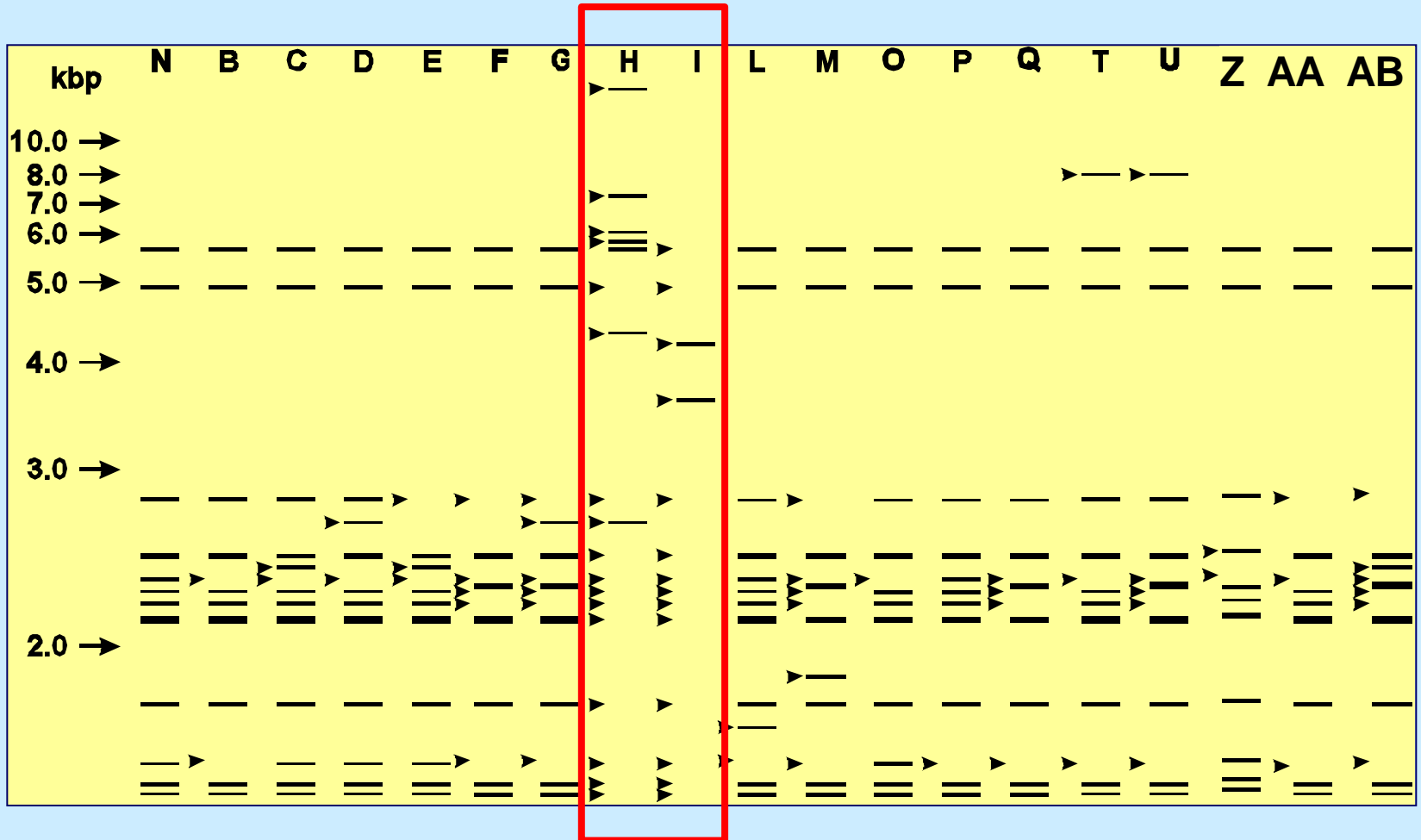


# ***Využití při epidemiologických studiích***

# *Původ celkem 137 izolátů*



# *RFLP typy získané u ptáků, zvířat a lidí*



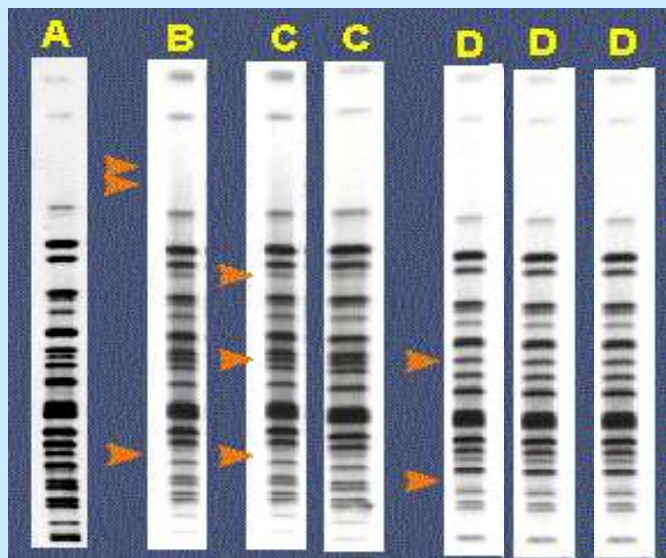
**Specifické profily u izolátů od lidí**



# ***Standardizace metody***

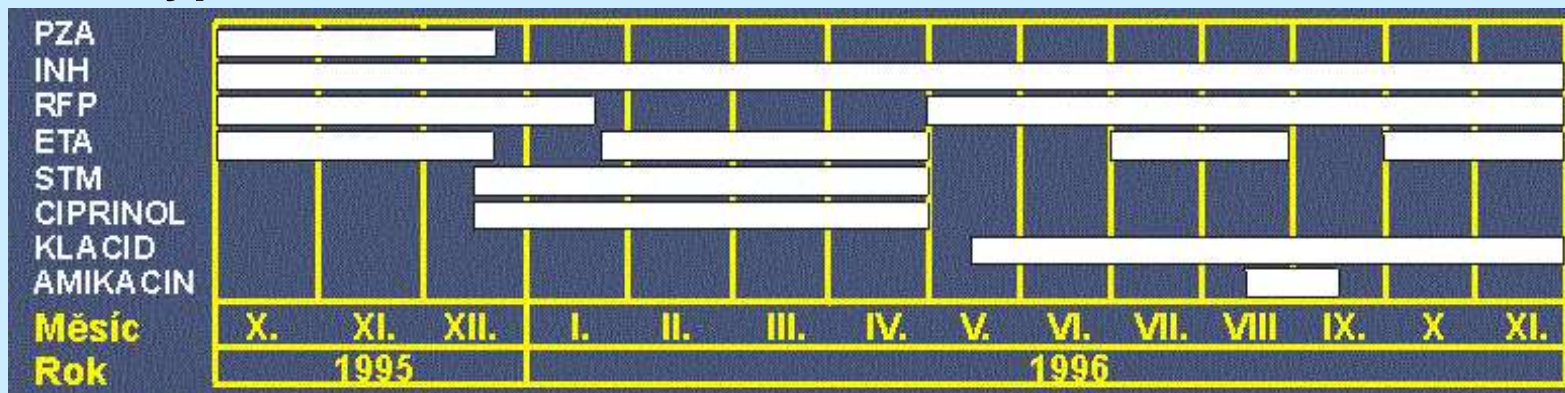
**Dvorská, L. – Bull, T.J. – Bartoš, M. –  
Mátlová, L. - Švástová, P. – Weston, T.R. -  
Parmová, I. – Van Soolingen, D. - Pavlík, I.:**  
**A standardised Restriction Fragment  
Length Polymorphism (RFLP) method for  
typing *Mycobacterium avium* strains links  
IS901 with virulence for birds.**  
**Journal of Microbiological Methods;**  
**2003, 55, 11-27**

# Analýza klinického případu u člověka



Serotyp

6 6/9 9 9 6/9 9 9



# *Analýza primokultur*



**A**



**A**

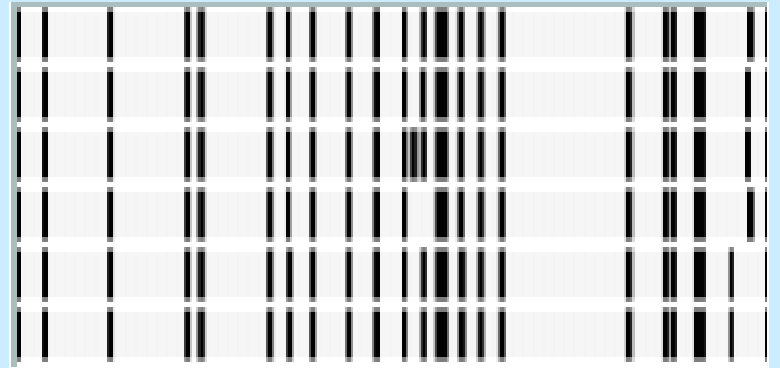
**A**

**A1**

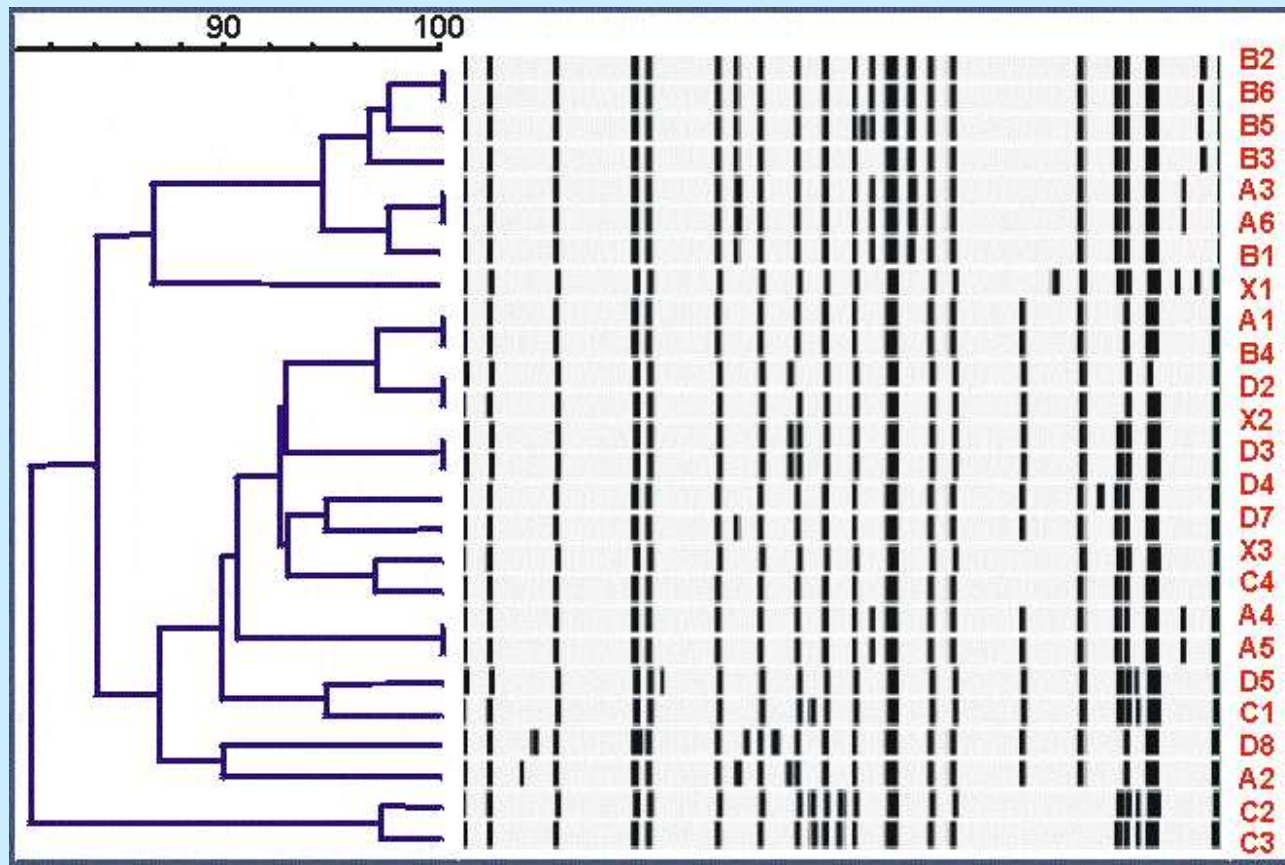
**A2**

**A3**

**A3**



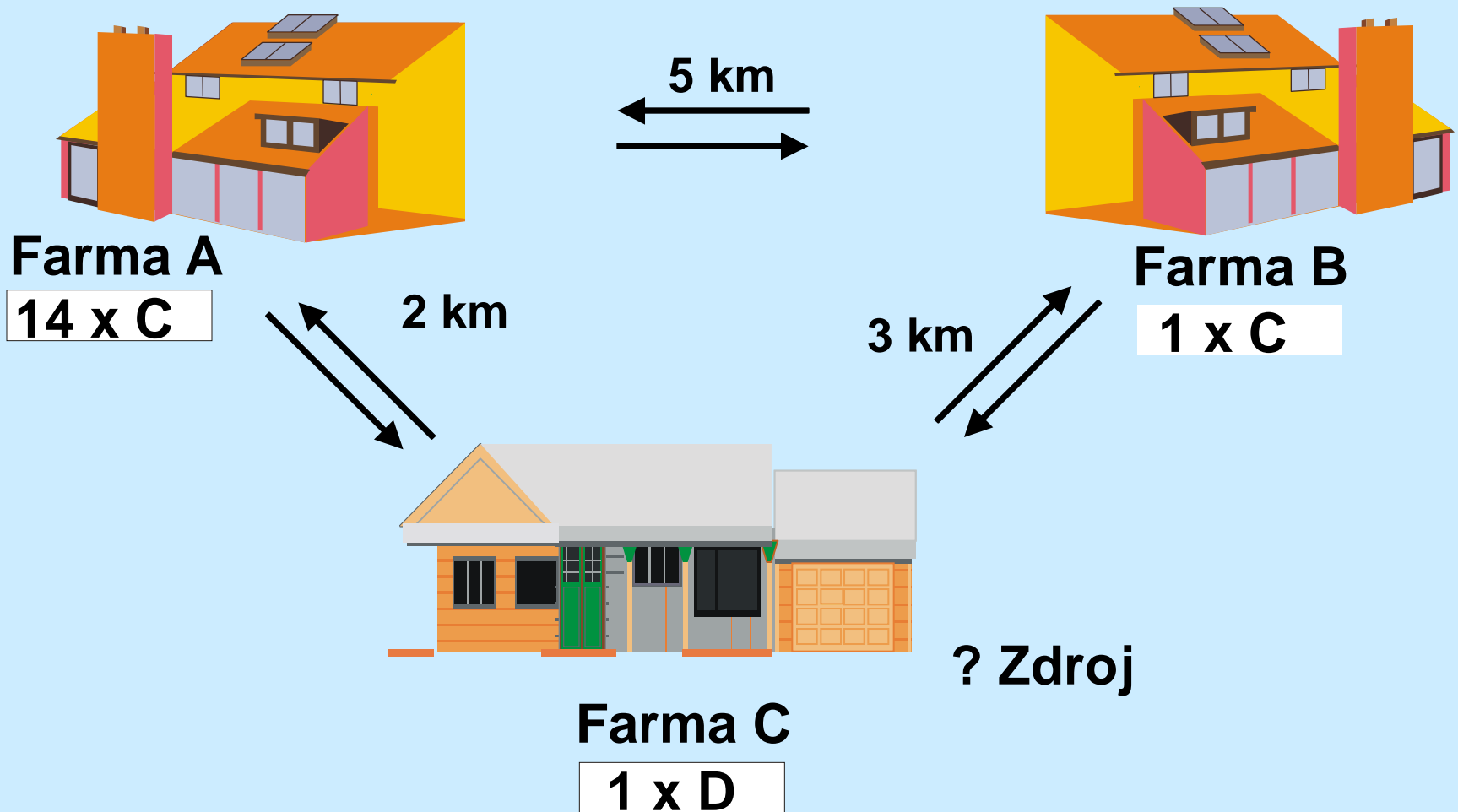
# *Analýza sekundárních kultur*



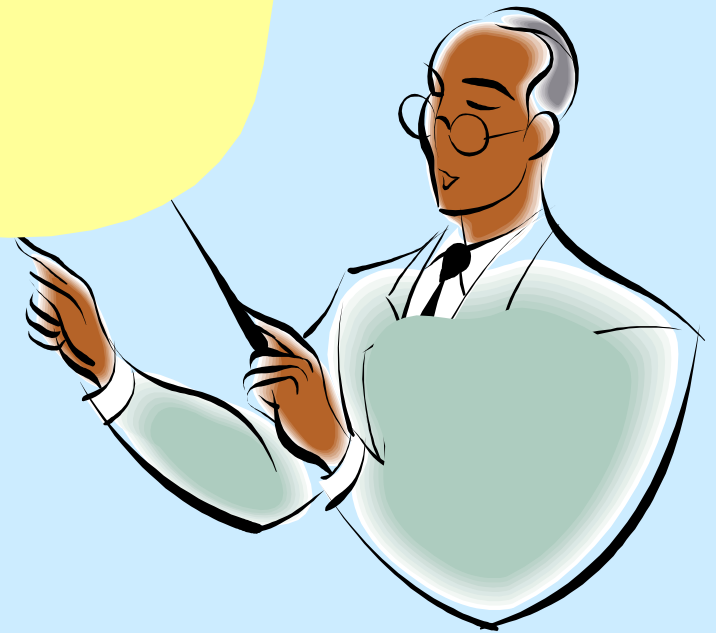
# ***Pracovní hypotézy***

- 1) Opakovaná infekce z vnějšího zdroje**
- 2) Dočasné utlumení infekce a její reaktivace**
- 3) Selektce rezistentních kmenů  
antituberkulotiky**

# *Studium přenosu MAA mezi různými farmami*



**Ke studiu epidemiologie *M. a.*  
*paratuberculosis* se používá  
IS900**



# ***RFLP profily na bázi IS900 - MAP***

## ***BstEI - IS900 RFLP profily***

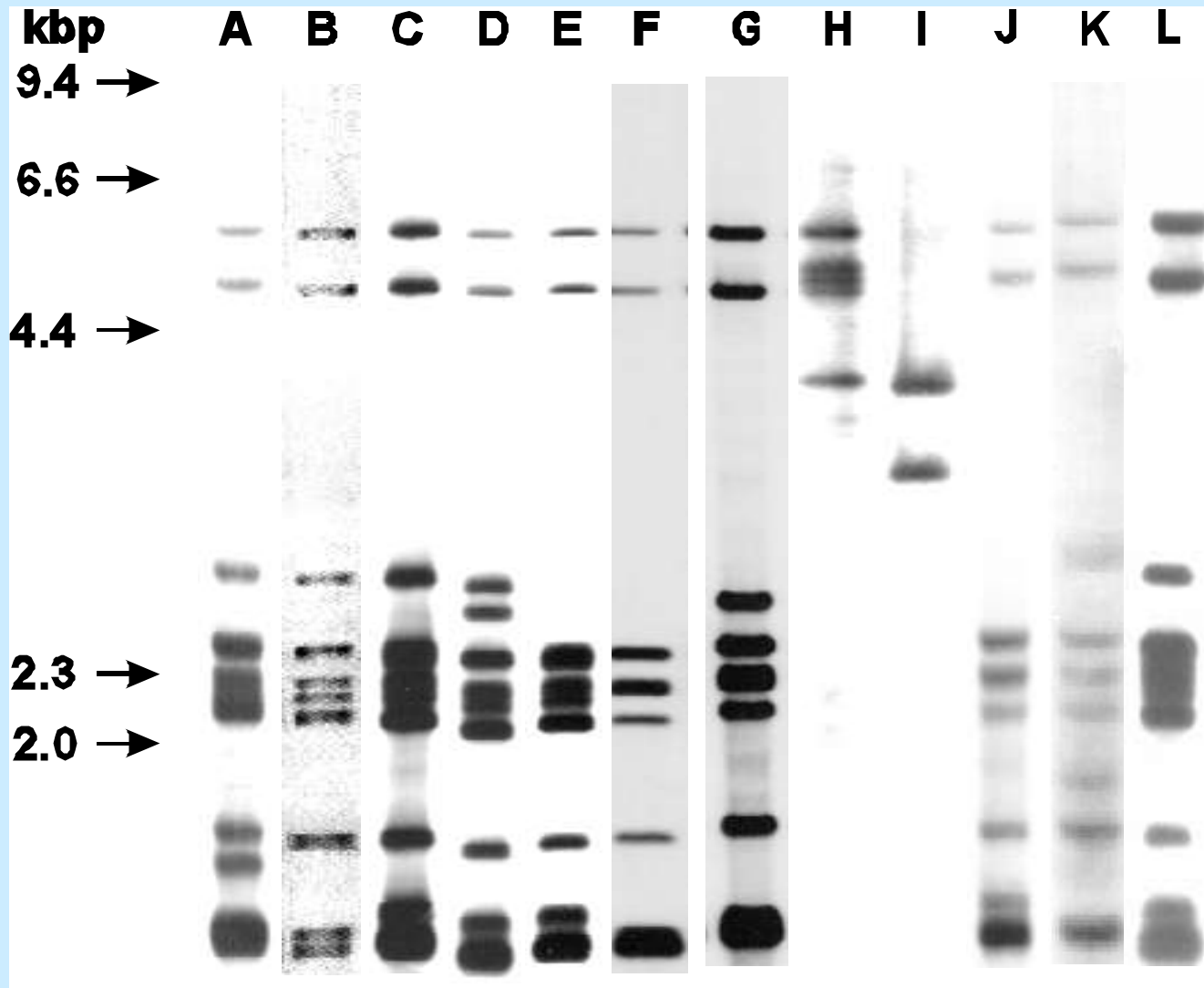
- **33 vícekopiových profilů**
- **3 profily s nízkým počtem kopií**
- **celkem 35 vícekopiových profilů**

## ***PstI - IS900 RFLP profily***

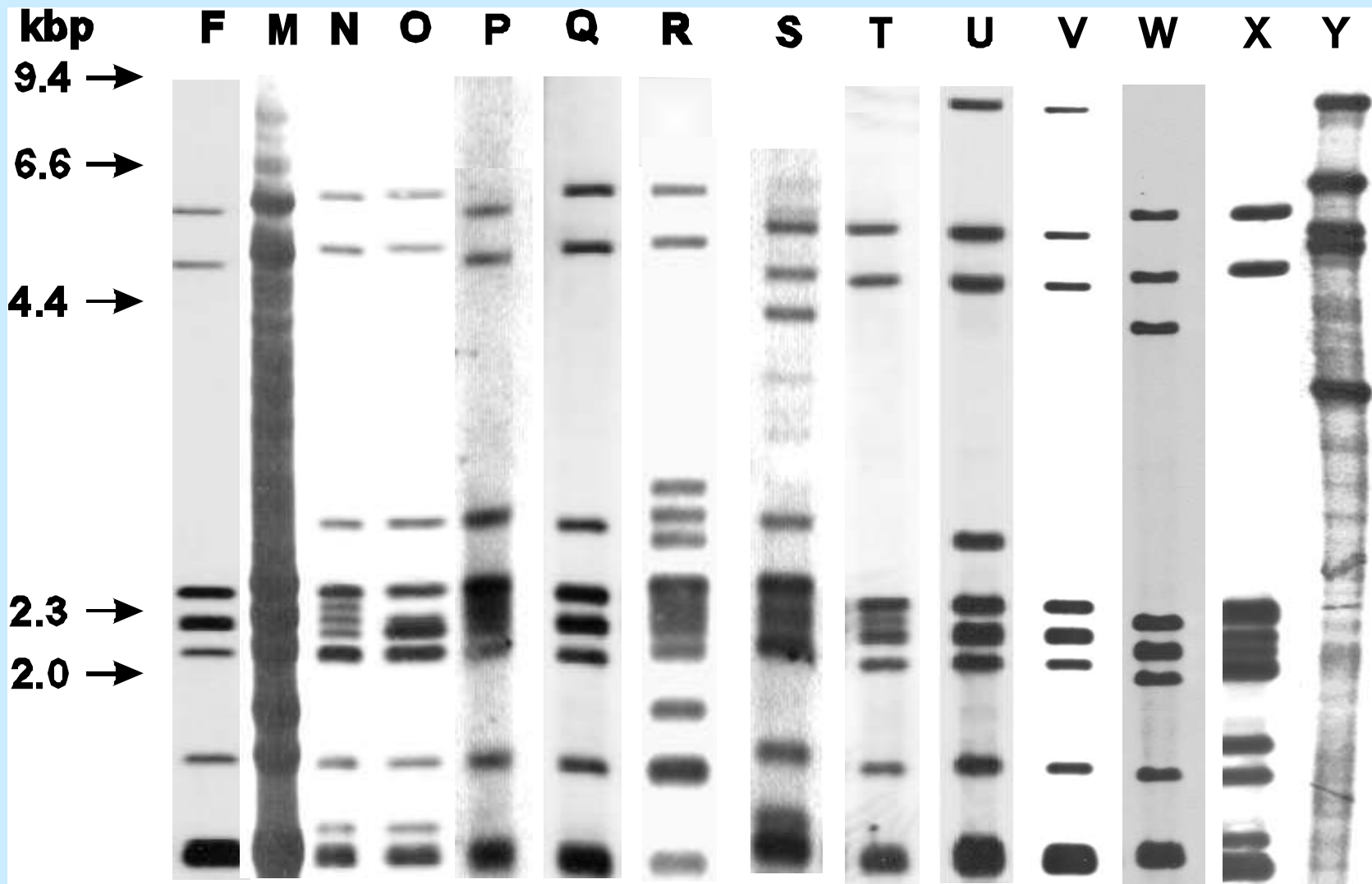
- **24 vícekopiových profilů**
- **1 profil s nízkým počtem kopií**
- **celkem 25 RFLP typů**



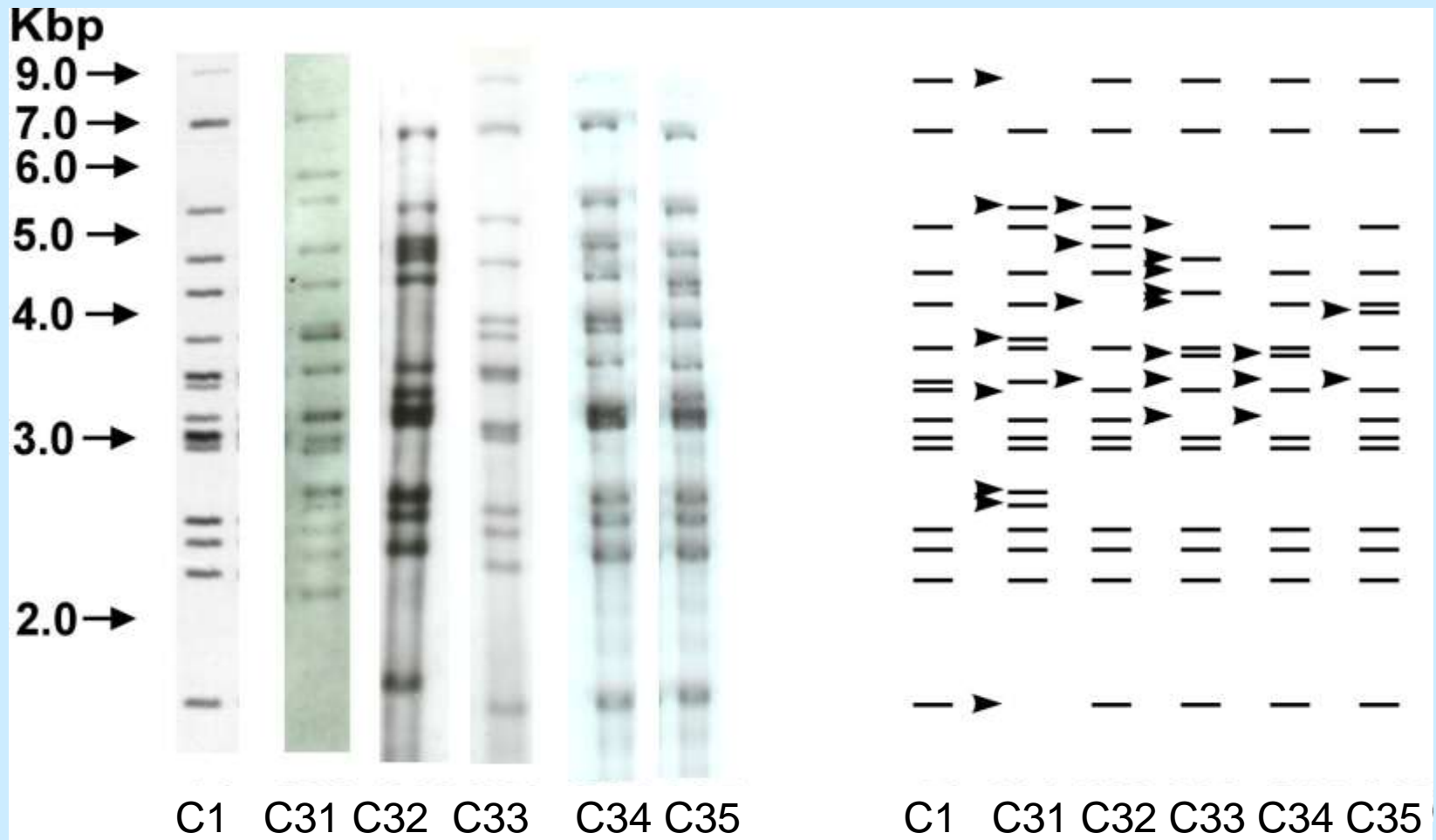
# *BstEII* - IS900 RFLP profily I



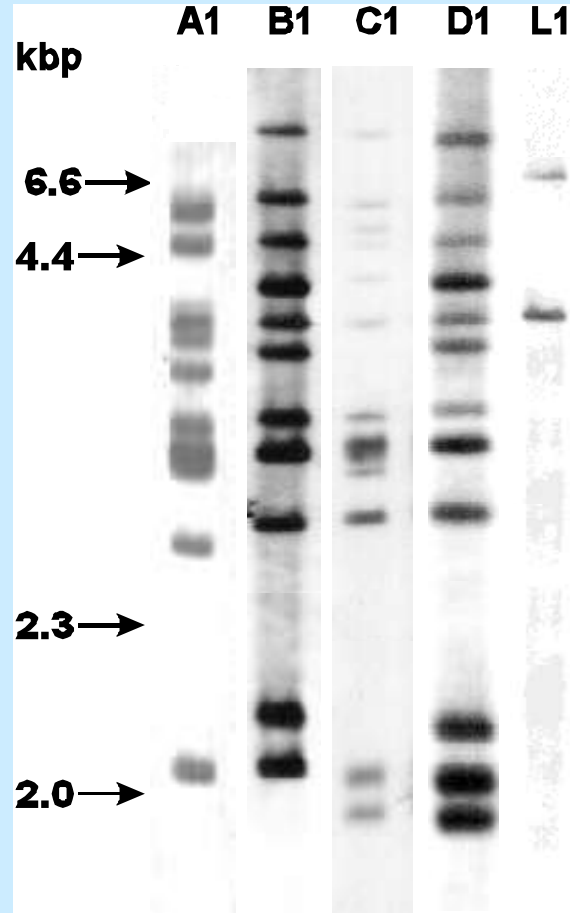
# *BstEII* - IS900 RFLP profily II



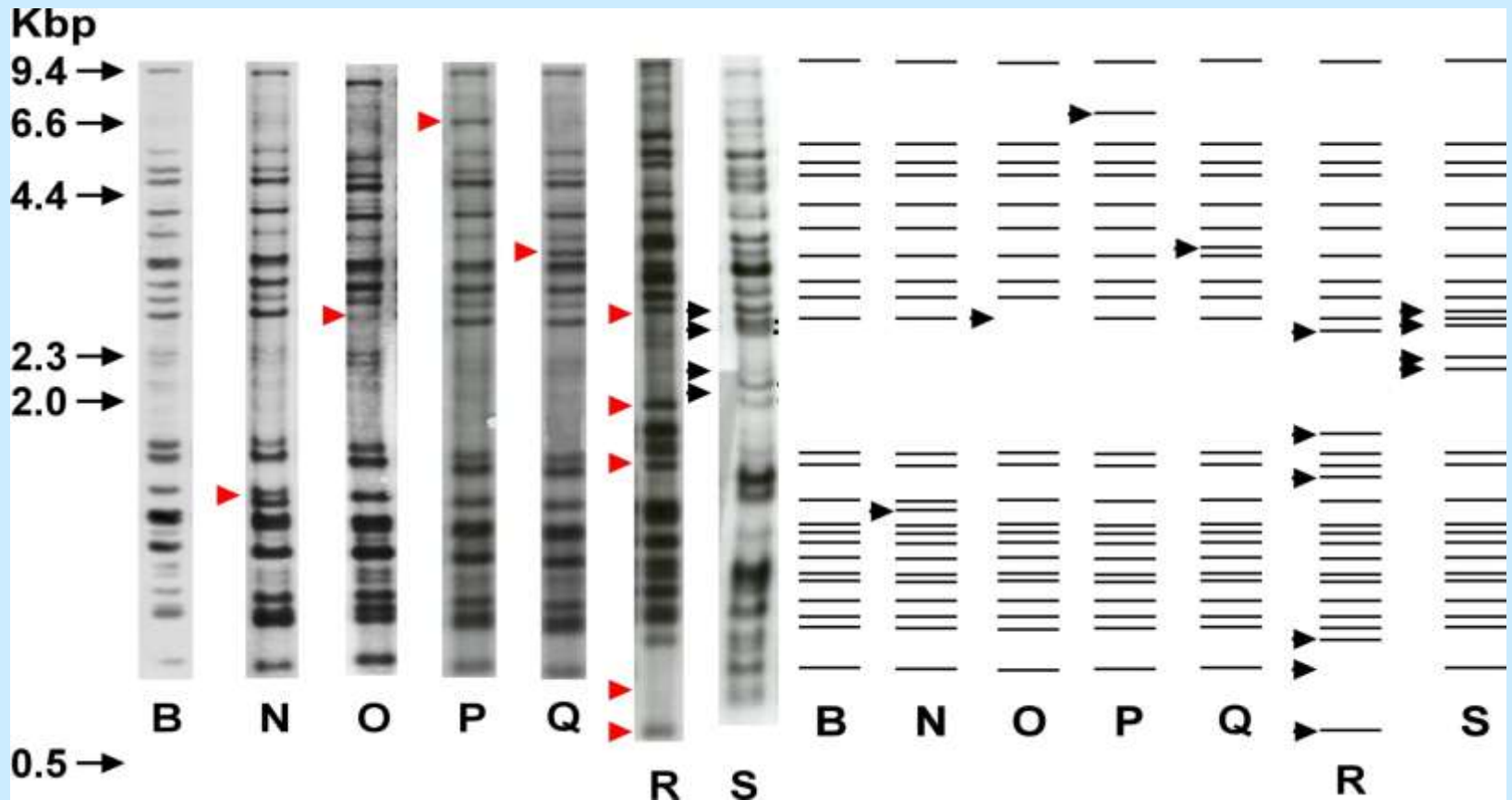
# *BstEII* - IS900 RFLP profily III



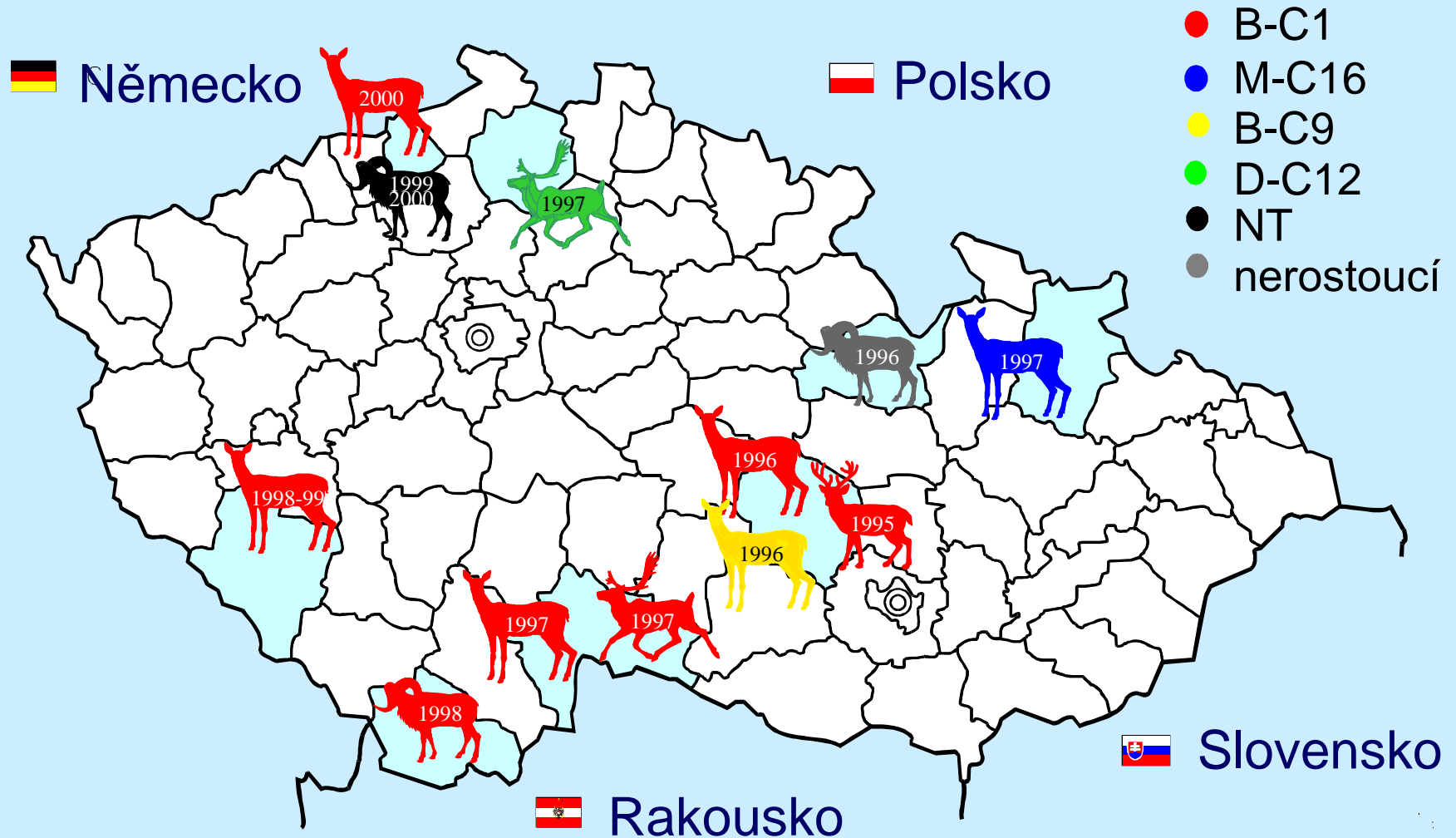
# *Pst*I - IS900 RFLP profily I



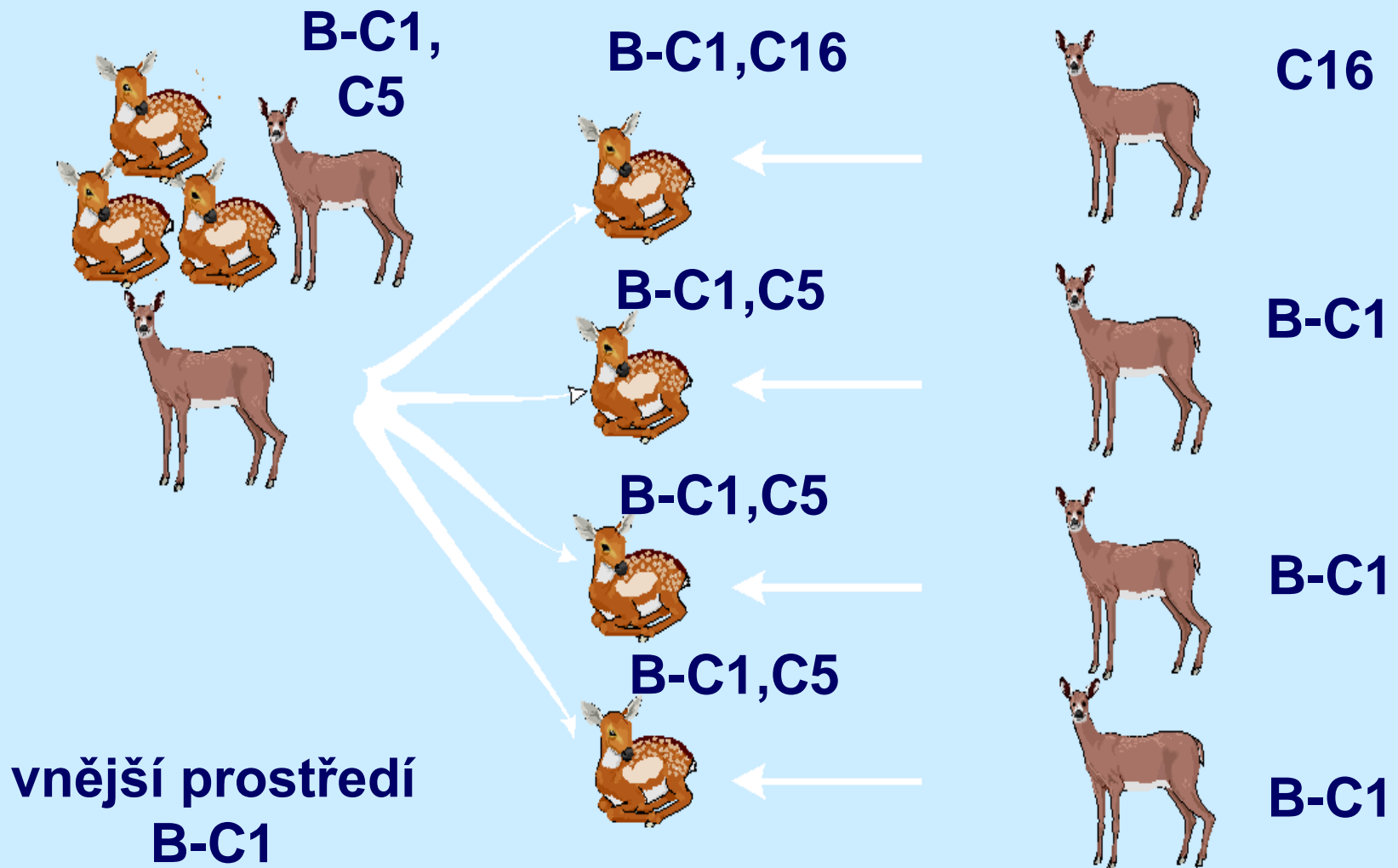
# *Pst*I - IS900 RFLP profily II



# Paratuberkulóza u divokých přežvýkavců v ČR (1995-2000)

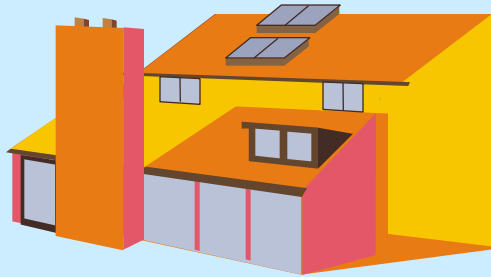


# Paratuberkulóza u faremčně chovaných jelenů



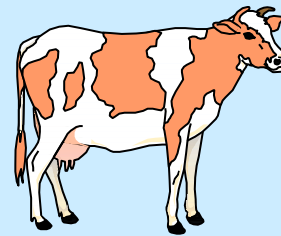
# Detekce tří kmenů různých RFLP typů u jedné krávy

V letech 1995 až 2001



C1 C9

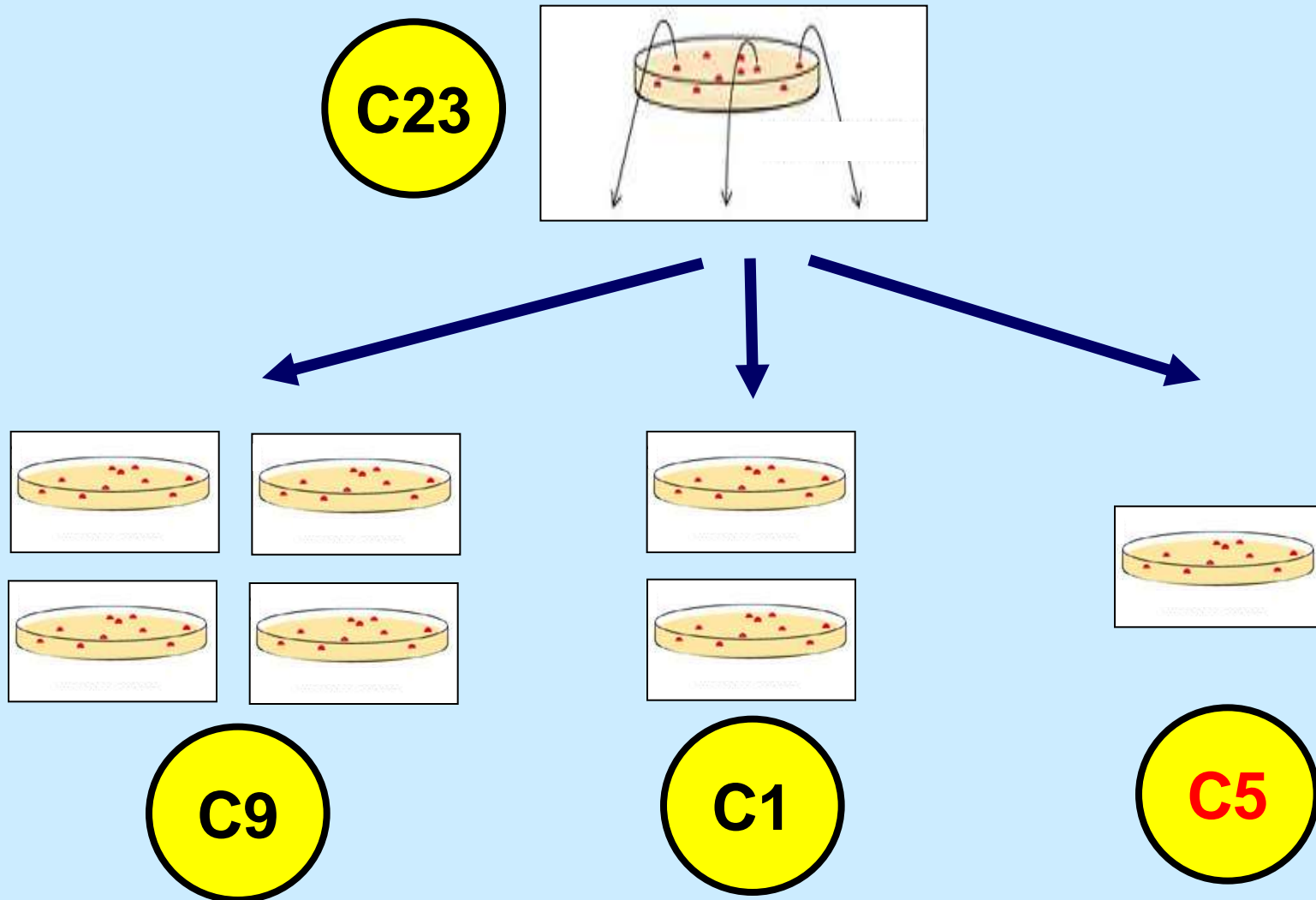
V roce 2002



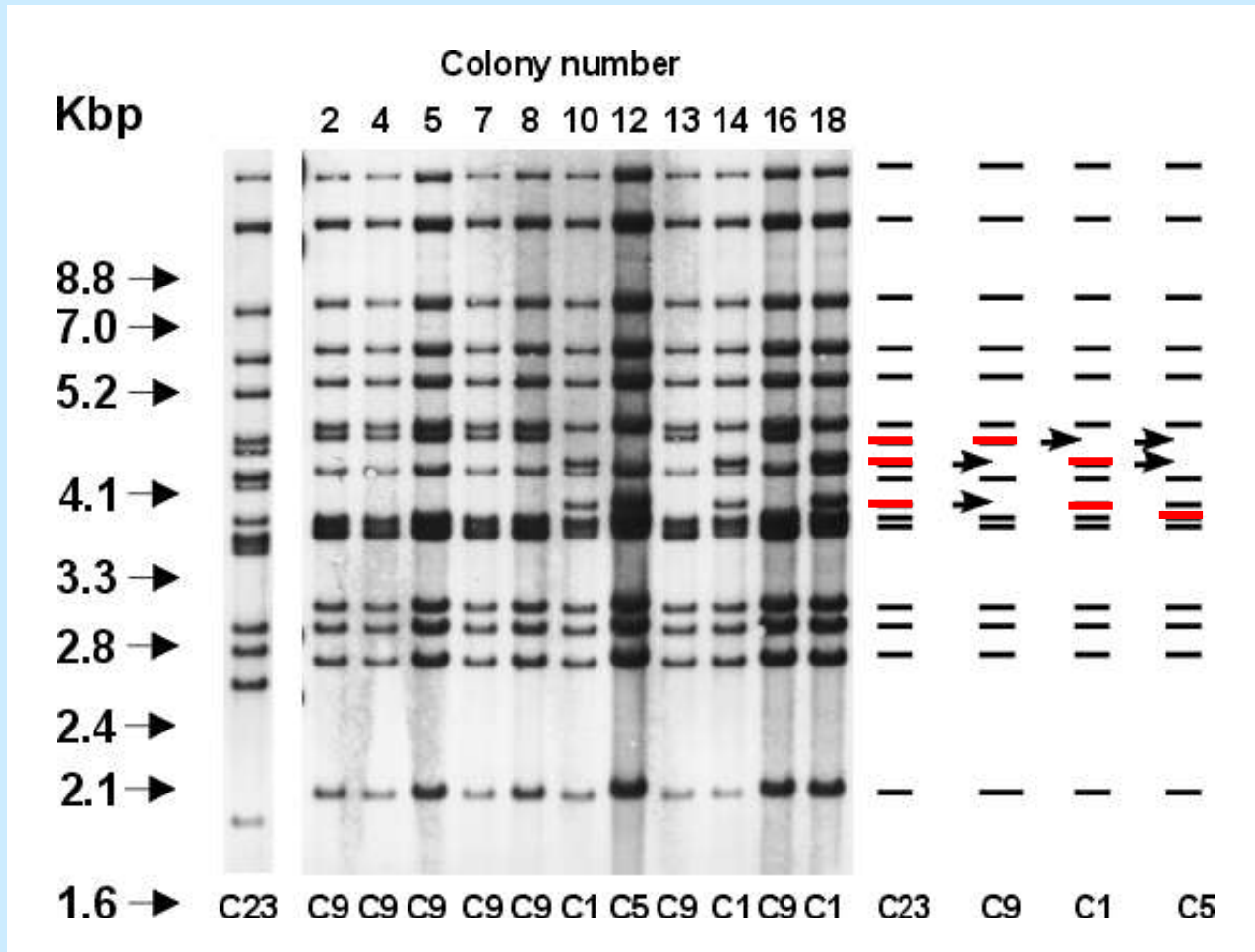
C23



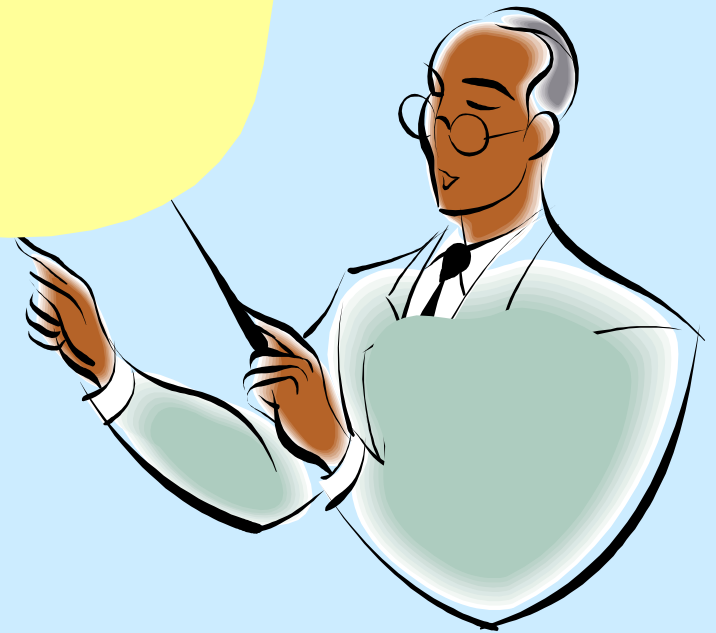
# Rozklonování izolátu č. 23



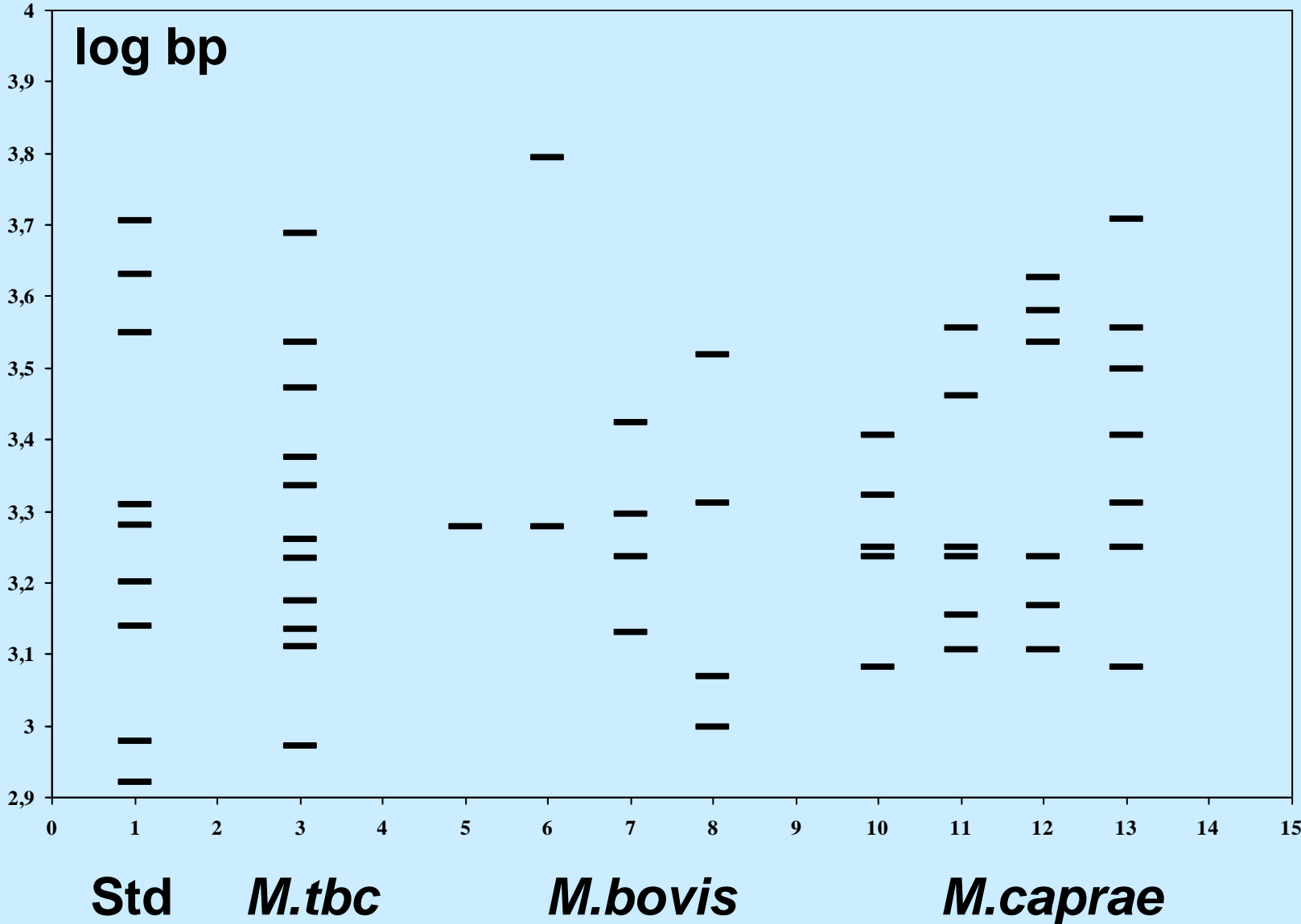
# Porovnání výsledných RFLP profilů



**Pro studium epidemiologie  
*M. tuberculosis* se používá  
IS6110**



# IS 6110 RFLP *M. tuberculosis*, *M. bovis* a *M. caprae*





**Proč to celé neosekvenujete a hotovo!**

**Není tato metoda dnes poněkud zastaralá?**

**Sekvenování je příliš citlivá metoda a nesnadno odhaluje klonalitu**



# ***Ribotypizace***

**Varianta RFLP využívající sond připravených z genů pro 16S rRNA nebo 23S rRNA**

- **Sekvence genu pro 16S rRNA se používají k fylogenetickým studiím**
- **Počet kopií genu pro 16S rRNA je malý, do 6 ks**
- **Výsledná spektra jsou jednoduchá**
- **Popsáno u *Listeria* (80 spekter), *Salmonella* (97), *Escherichia* (65) a *Staphylococcus* (252)**

# *Zodpovězte otázku*

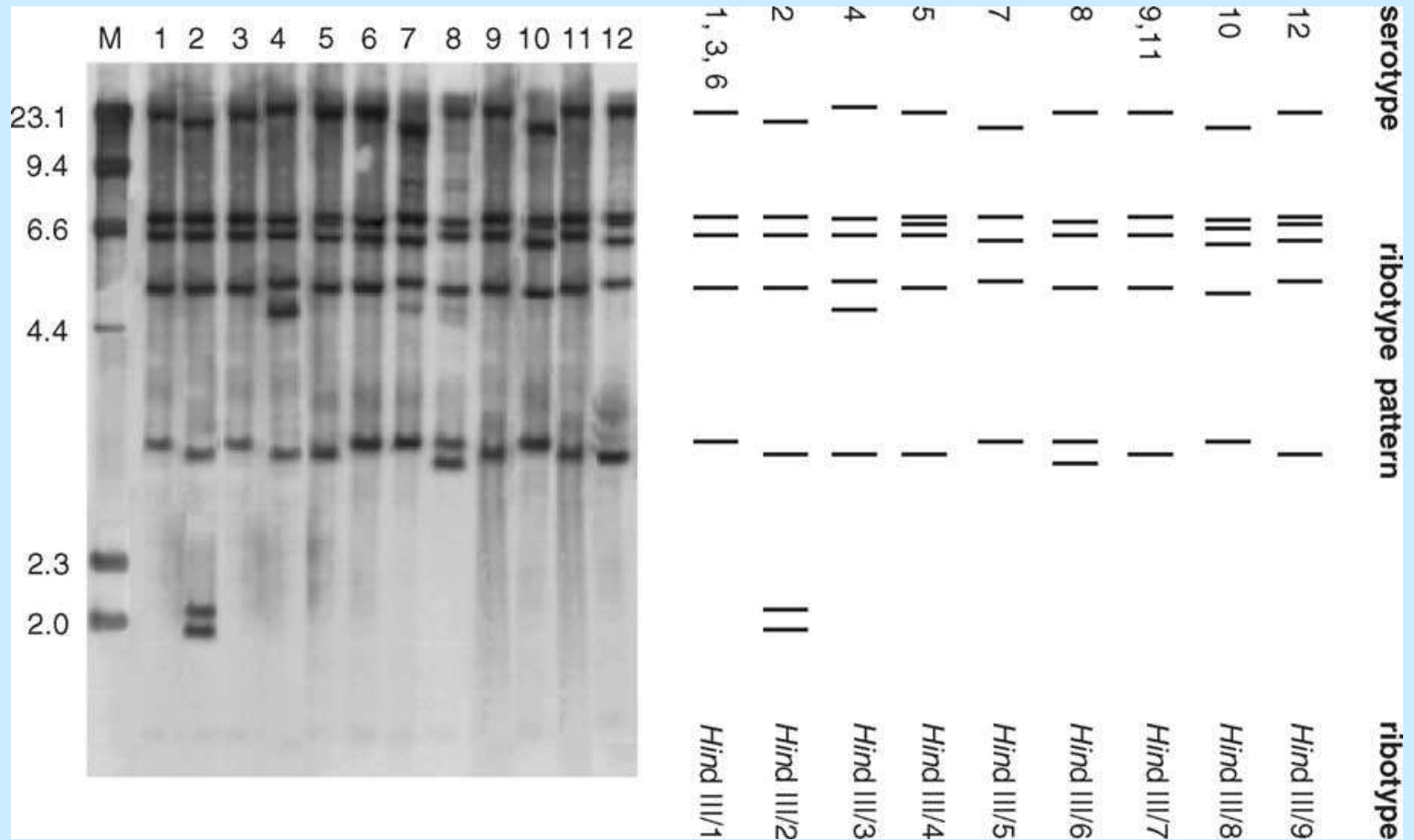


**Kde se v buňce nachází 16S rRNA?**

**A kde se nachází 23S rRNA?**

# Ribotypizace

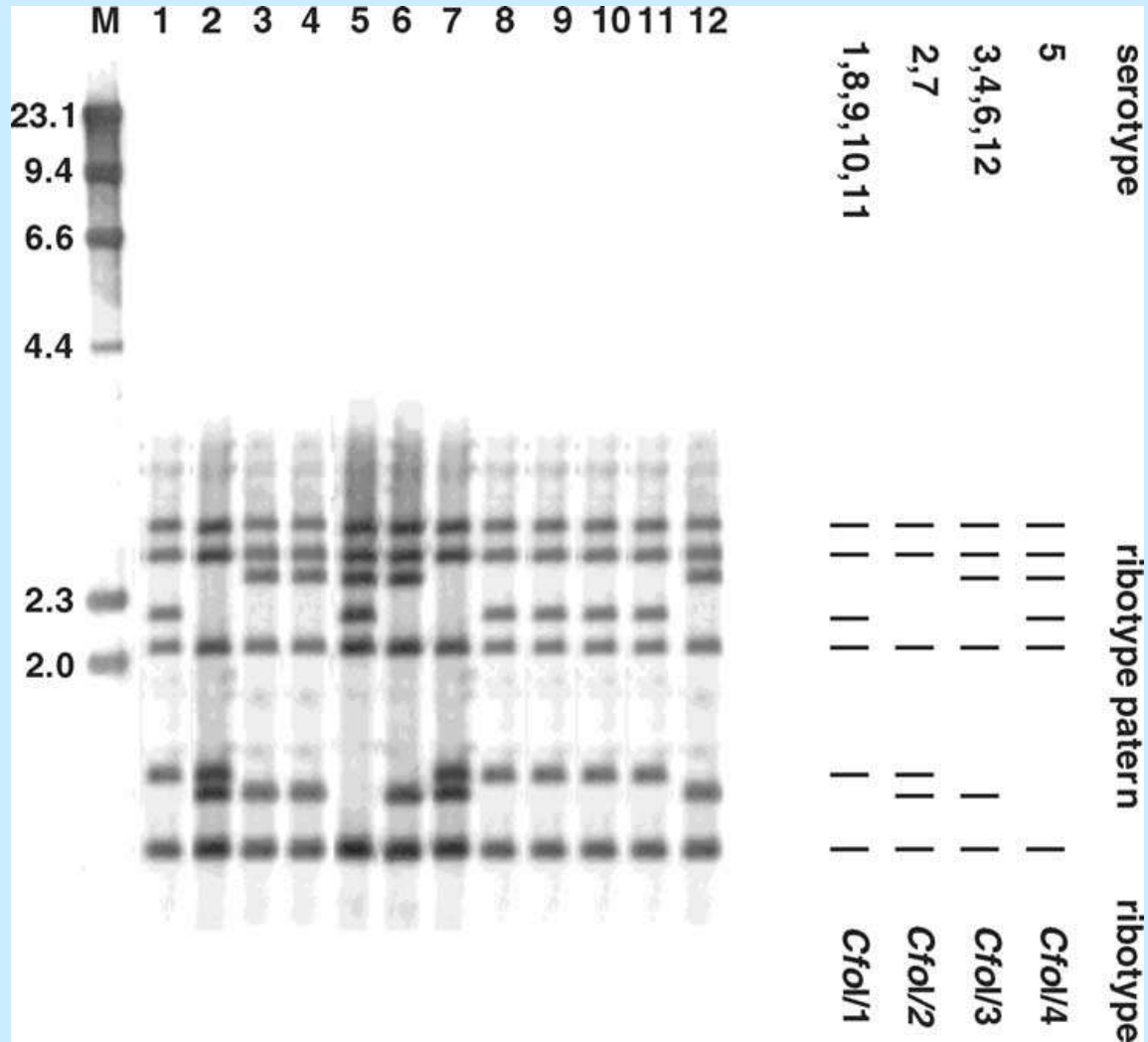
## *Actinobacillus pleuropneumoniae* 16S rRNA/*Hind*III





# Ribotypizace

## *Actinobacillus pleuropneumoniae* 16S rRNA/CfoI



# Úkol



Analýzou výše uvedených spekter ribotypů stanovte počet genů pro 16S rRNA u *Actinobacillus pleuropneumoniae*, jestliže ani *Hind*III ani *Cfo*I neštěpí uvnitř genu.

Ze spekter po štěpení *Cfo*I vyplývá, že je zde 6 kopií genu pro 16S rRNA.

Spektra po štěpení *Hind*III nejsou čistá.

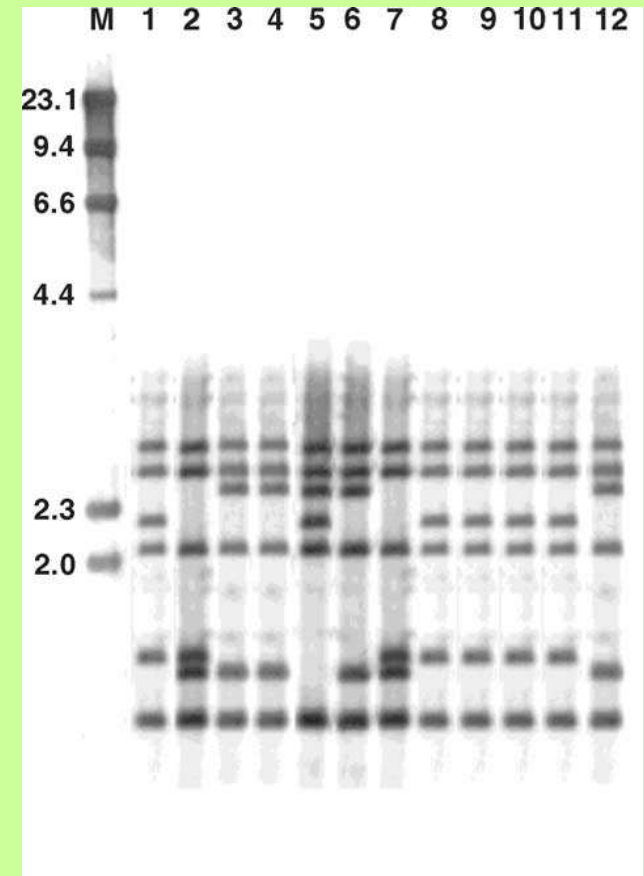


# *A ještě jeden, komplikovanější úkol*



Analyzujte následující spektrum a odhadněte, co se mohlo stát

- 1) Porovnejte vzorek č. 1 a 2
- 2) Najděte další podobné události
- 3) Co je méně pravděpodobné?



# Řešení?



Toto jsou možná vysvětlení, zájemci mohou i vypočítat délky změněných úseků

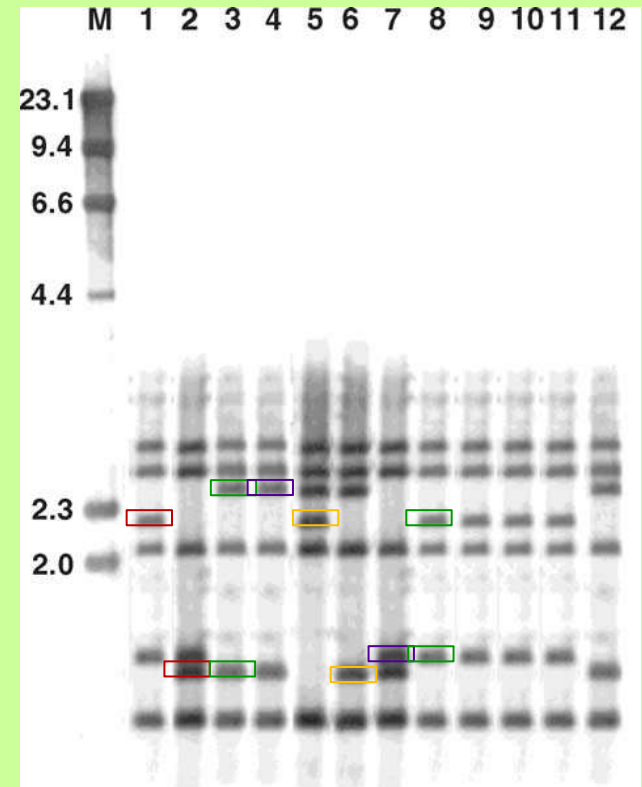
1) U vzorku č. 2 došlo k delecii (nebo u vzorku č. 1 k inzerci) úseku DNA

2a) Podobné mohlo nastat mezi vzorky 3-8 (3-1, apod.) – 2 události!

2b) Další možnost 4-7

2c) A ještě jedna možnost 5-6

3) Dvě události **versus** jedna jsou méně pravděpodobné



# Odhadněte evoluci ribotypů



Což třeba takhle

Cfol/4 (serotyp 5)



Cfol/3 (serotyp 3,4,6 a12)



Cfol/2 (serotyp 2,7)



Cfol/1 (serotyp 1,8,9,10 a 11)

serotypy	ribotype patern	ribotype
5	 	Cfol/4
3,4,6,12	 	Cfol/3
2,7	 	Cfol/2
1,8,9,10,11	 	Cfol/1



# Řešení?



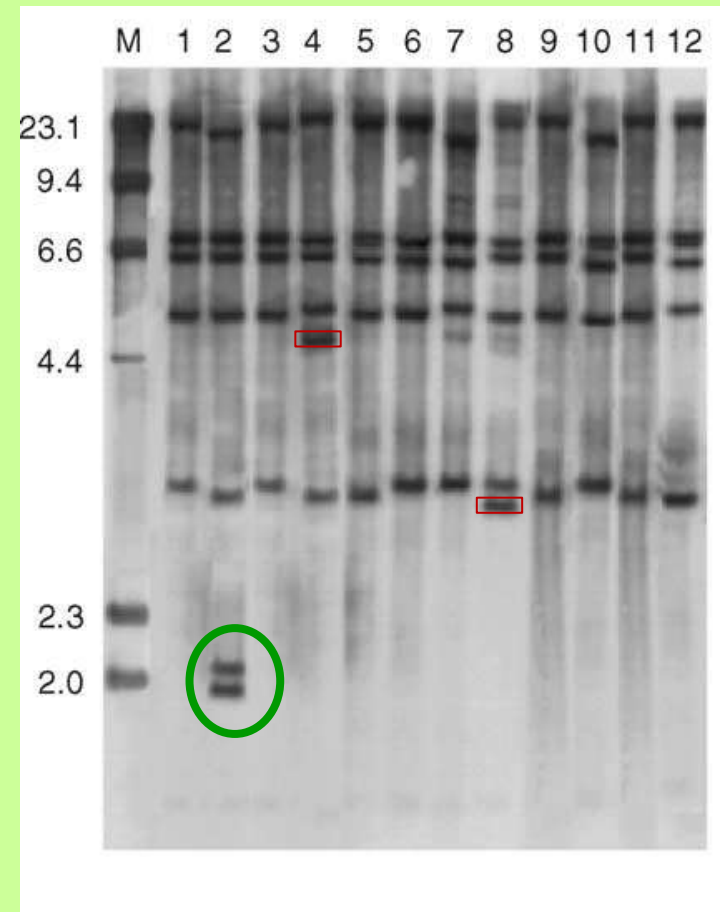
**Toto jsou možná vysvětlení, zájemci mohou i vypočítat délky změněných úseků**

**1) U vzorku č. 4 došlo k deleci (nebo u vzorku č. 8 k inzerci) úseku DNA**

**2a) U vzorku č. 5 se ztratilo jedno restrikční místo oproti č. 4 (nebo opačně)**

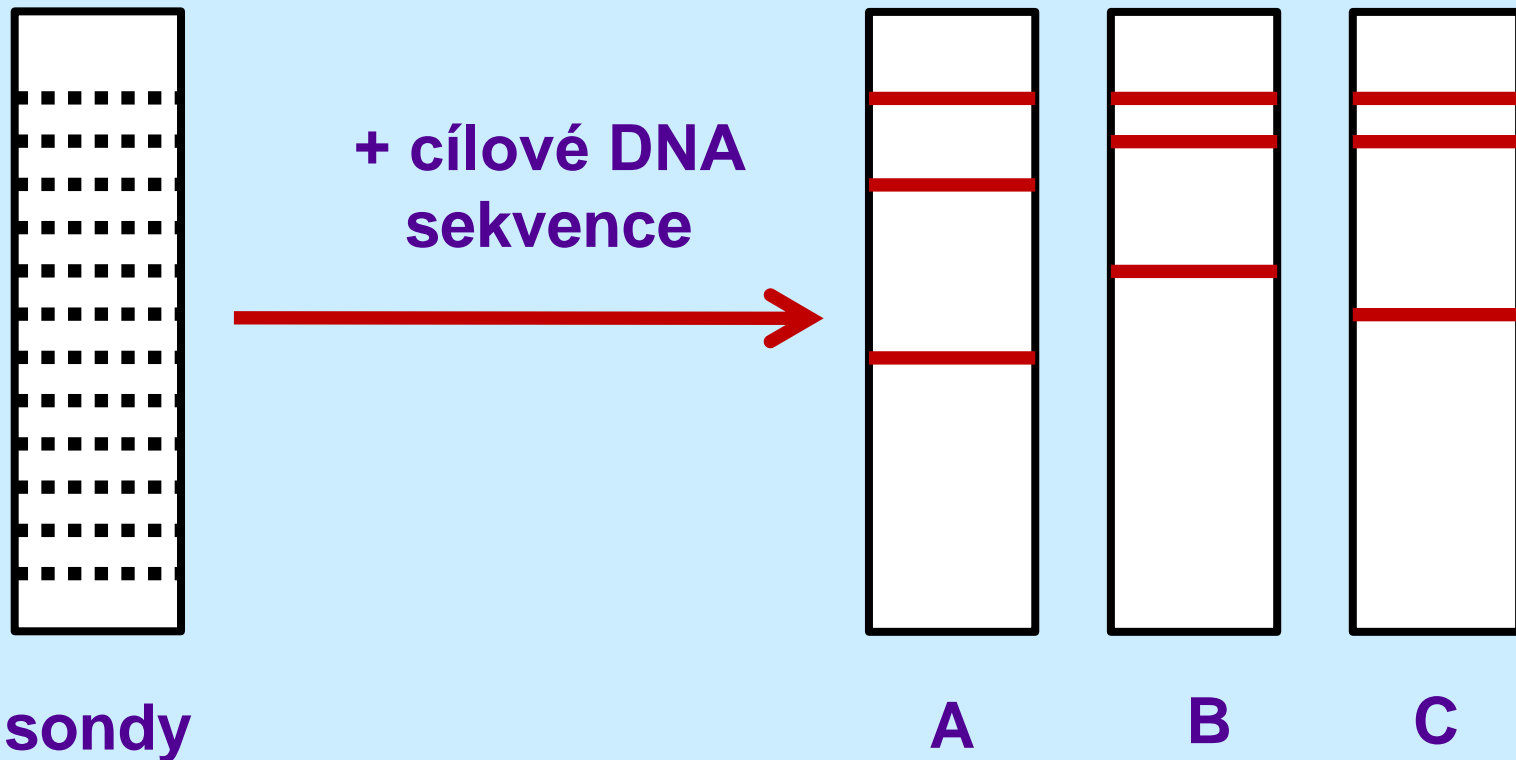
**2b) Přibyl/ubyl počet kopií**

**3) ???**



# Metoda reverzní hybridizace

- „Sonda“ je nanесena na pevný povrch
- Cílová sekvence je v tekuté fázi, zpravidla ve formě amplikonu po PCR



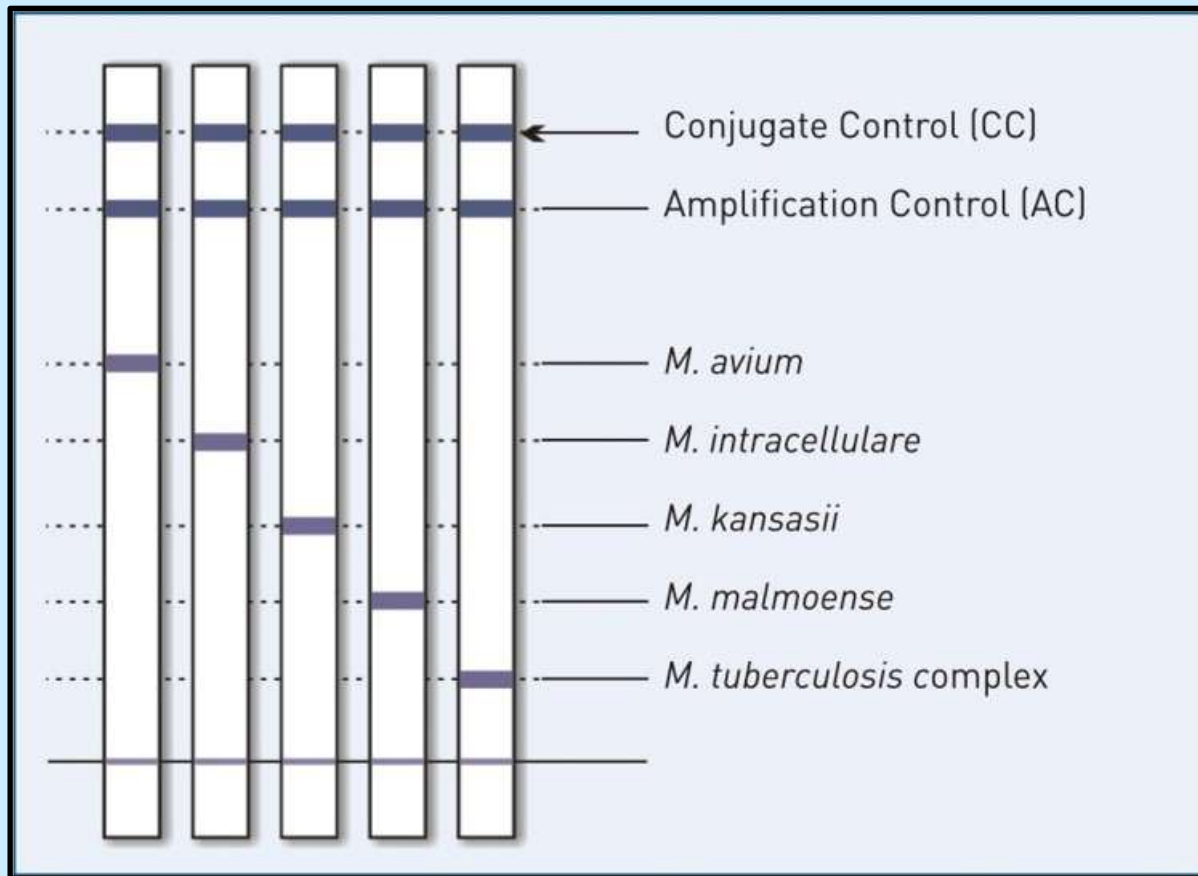


# *Tři jednoduché kroky*

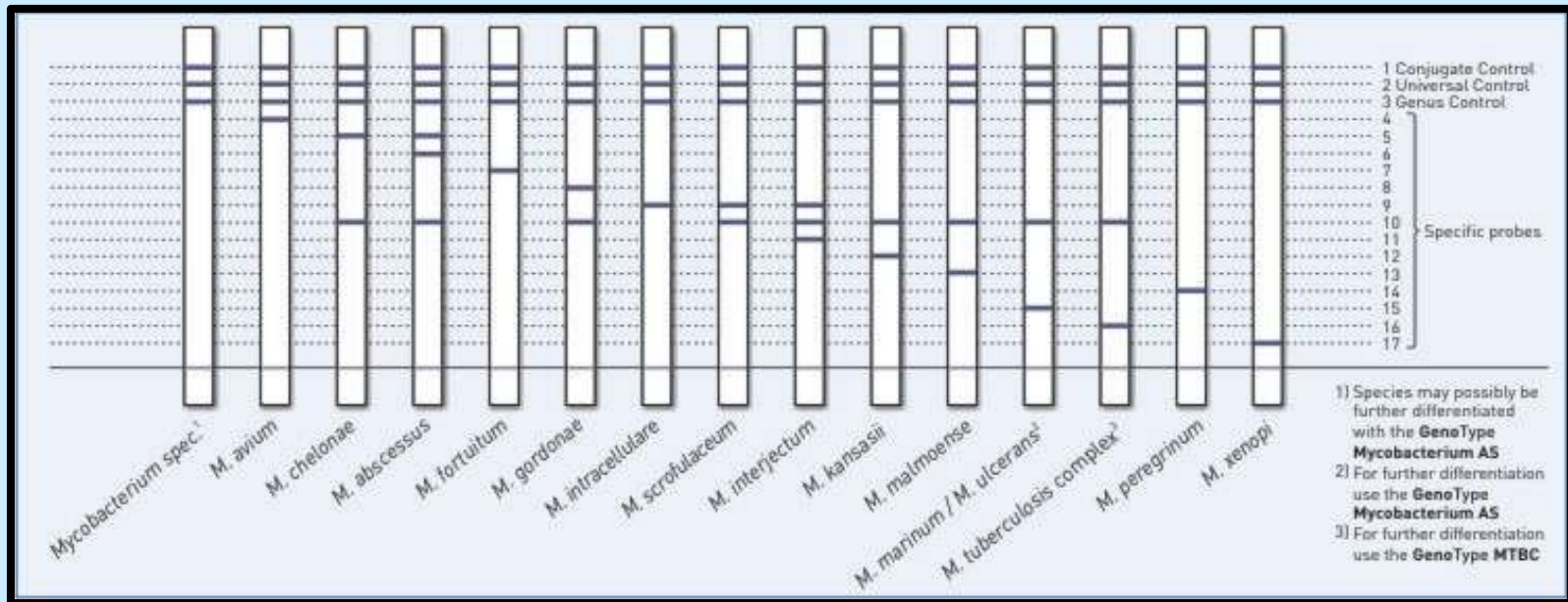
- **Izolace DNA ze vzorku**
- **Amplifikace cílové sekvence (PCR)**
- **Detekce značeného produktu na matrici**



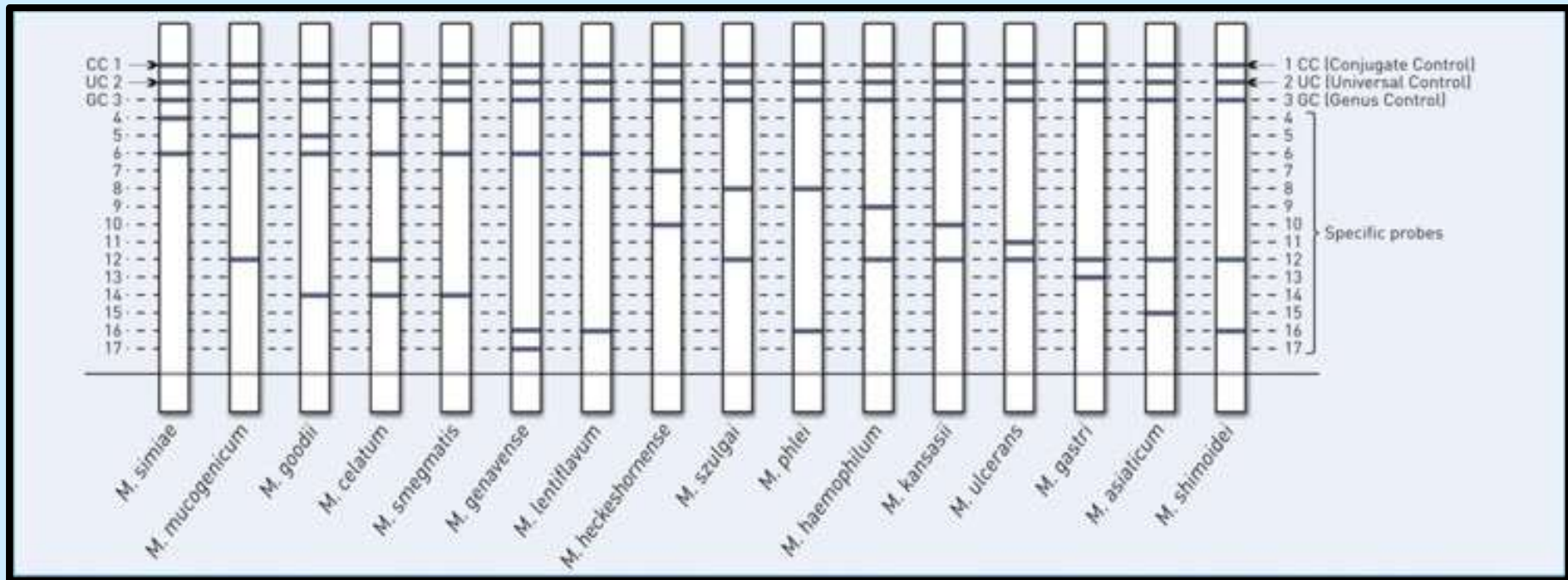
# Detekční systémy pro mykobakterie I



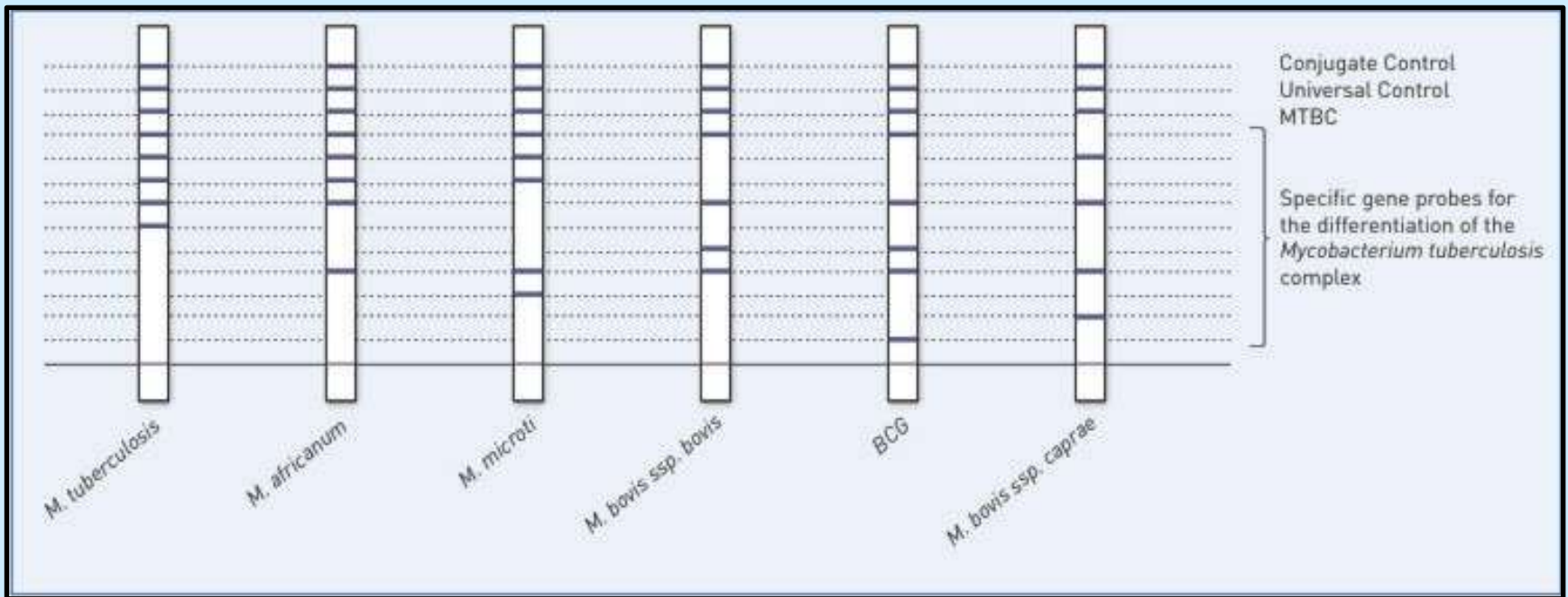
# Detekční systémy pro mykobakterie II



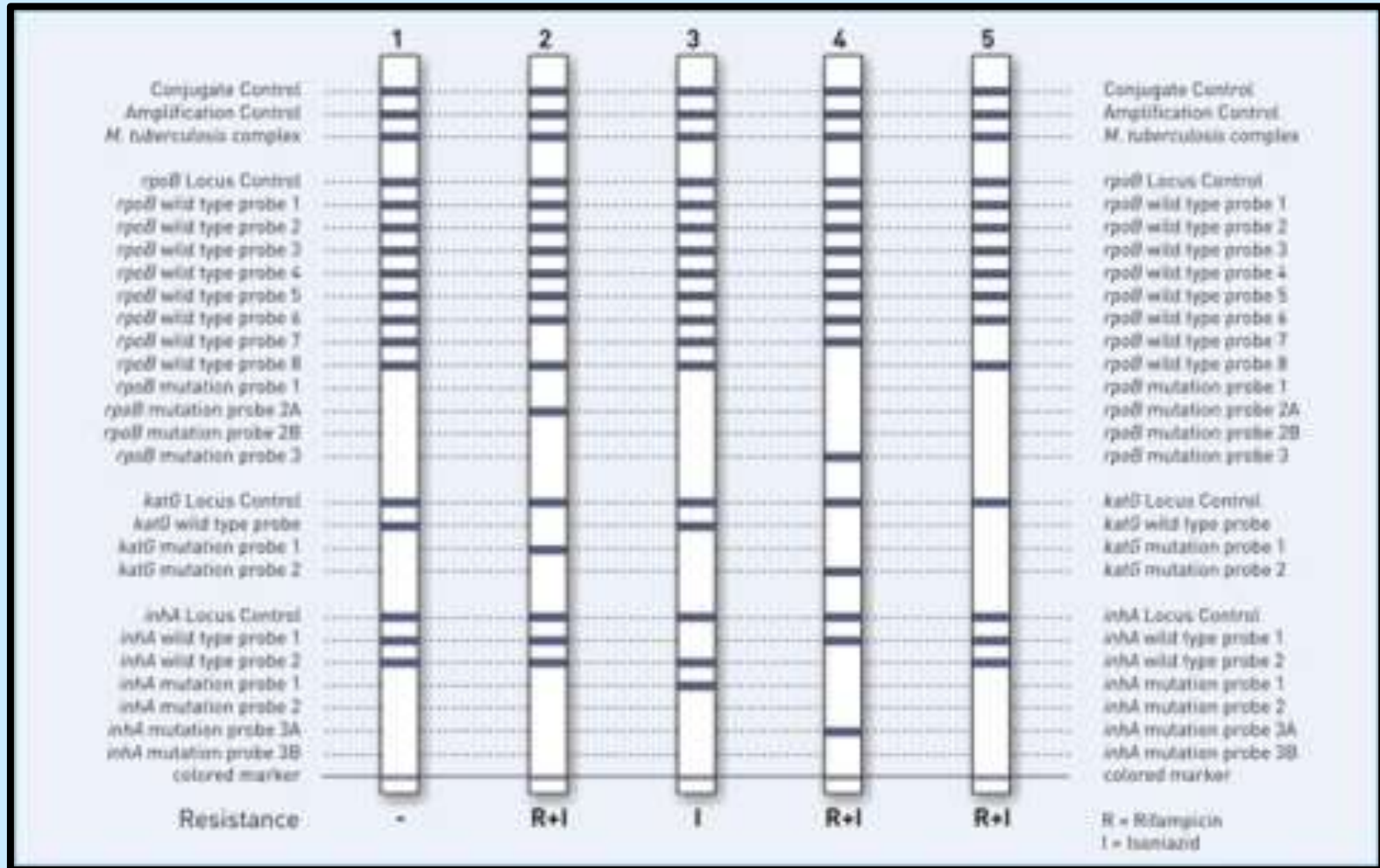
# Detekční systémy pro mykobakterie III



# Diferenciace zástupců MT komplex



# Detekce genů rezistence

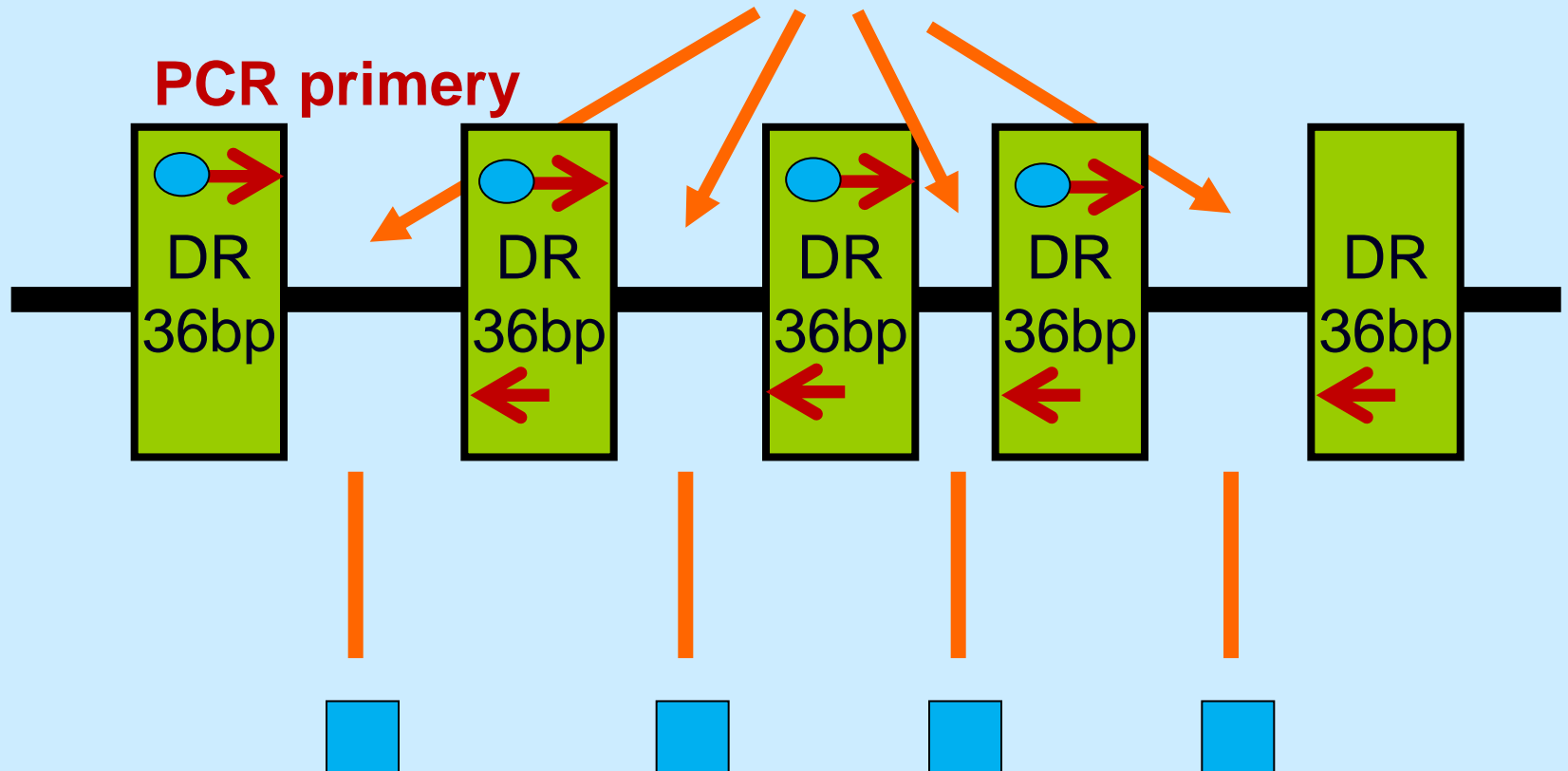


# ***Další systémy***

- **Multirezistentní kmeny *Staphylococcus aureus***
- **Detekce *Helicobacter pylori* + rezistence**
- **Detekce *Chlamydia trachomatis***
- **Detekce *Bordetella pertussis* a *B. parapertussis***
- ***Clostridium difficile* – diferenciaci mezi nepatogenními, virulentními a hypervirulentními kmeny**
- **Detekce desítek grampozitivních a gramnegativních druhů**
- **Geny pro Shiga toxin**
- **Vankomycin rezistentní enterokoky**
- **Detekce periodontopatogenních bakterií**

# Spoligotypizace

Mezerníky dlouhé 35-41bp

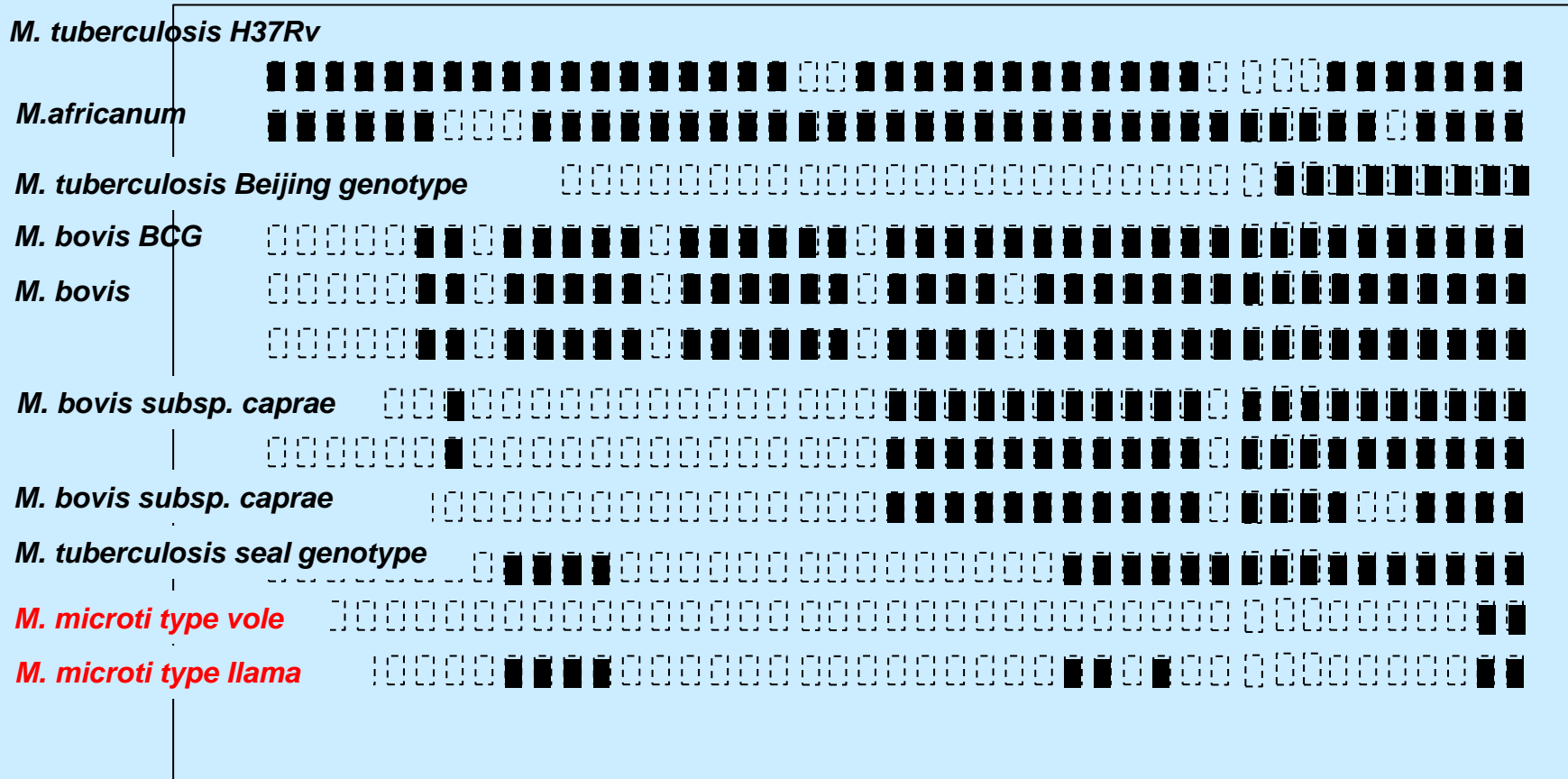


43 specifických oligonukleotidových sond vázaných na membránu



# Membrána pro spoligotyping

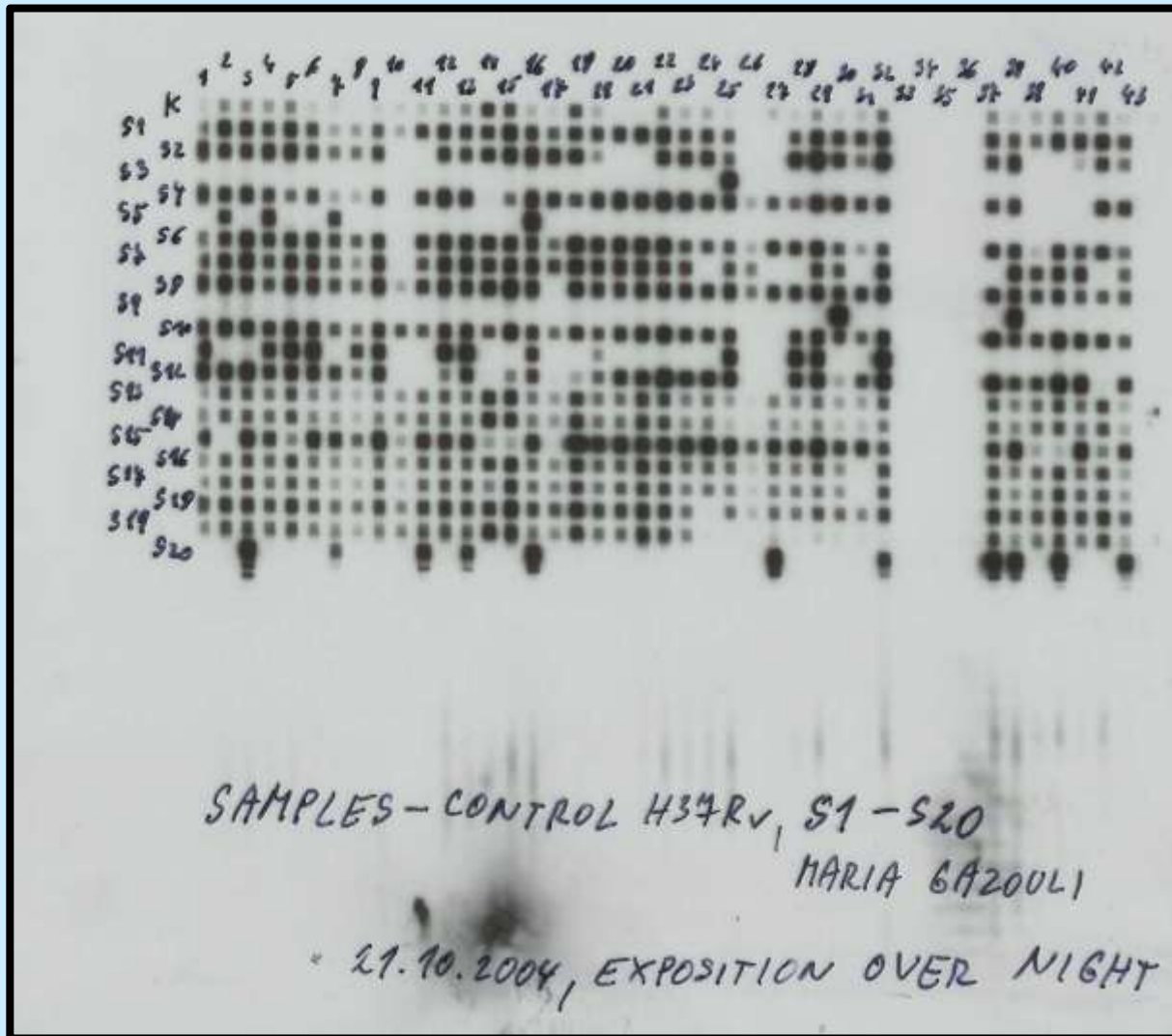
- 1) Membrána se 43 specifickými sondami
- 2) Hybridizuje se s produktem PCR
- 3) Vyhodnotí se výsledky



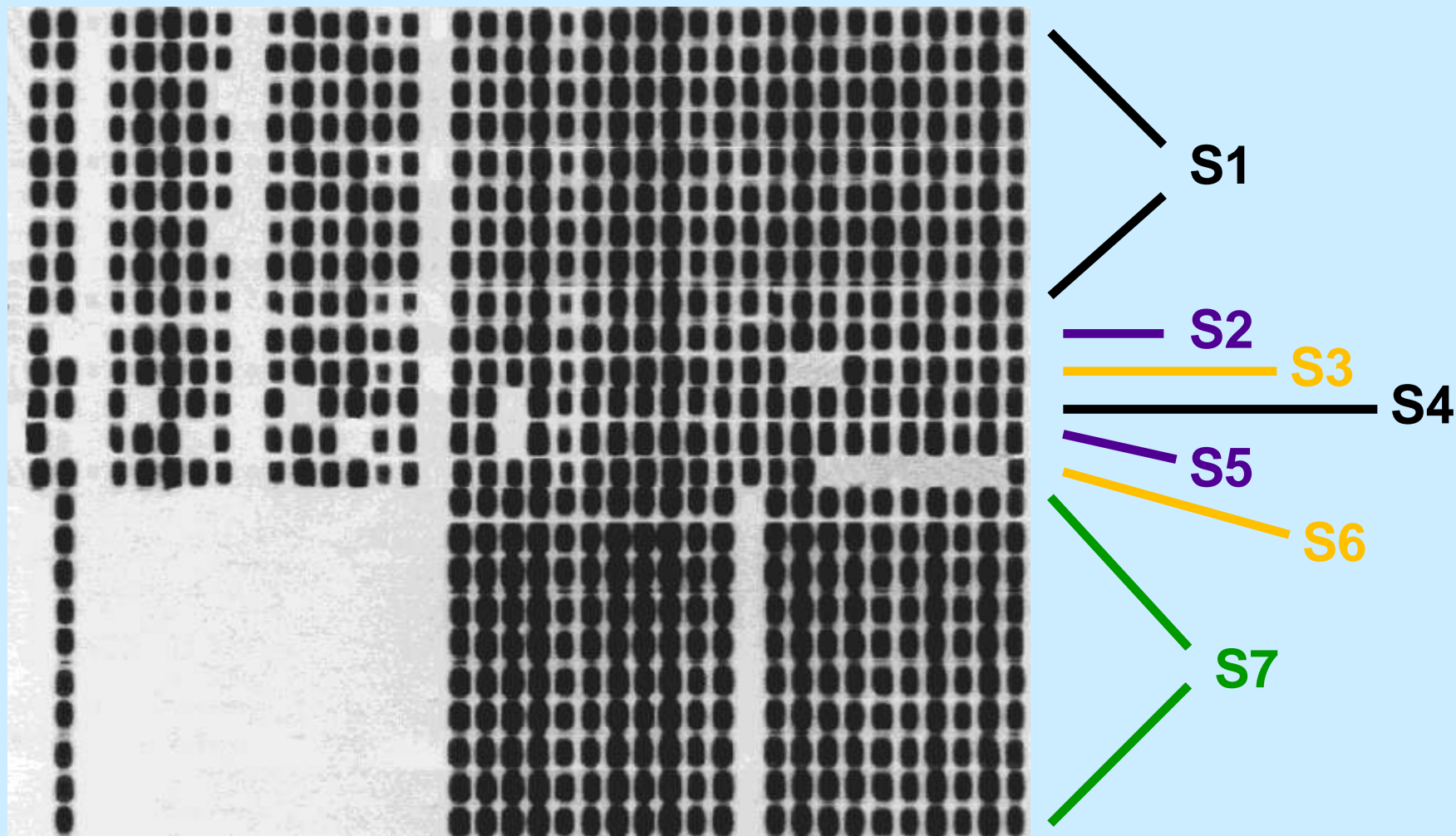
# Profily zástupců komplexu *M. tuberculosis*



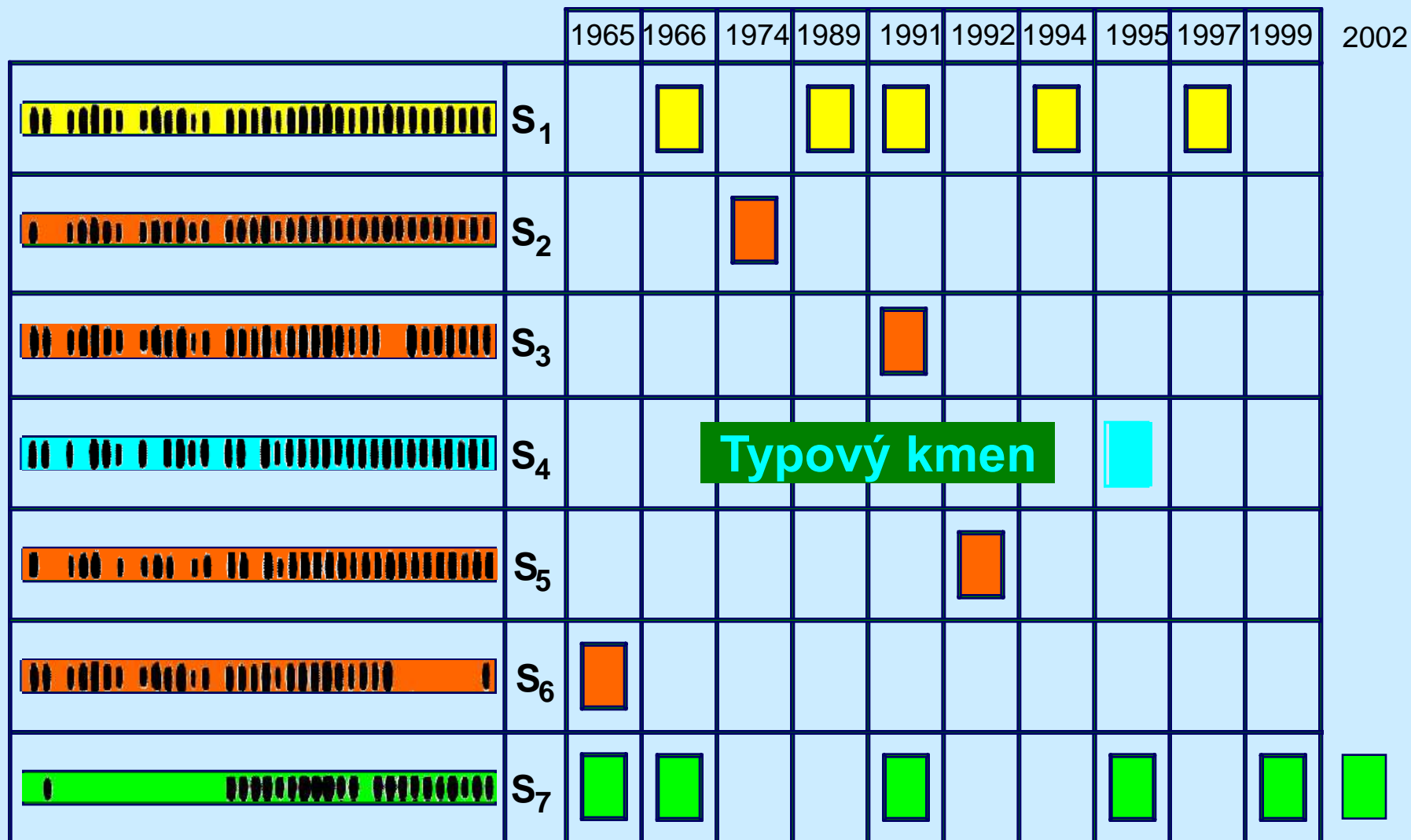
# Reálný záznam spoligotypizace



# Vyhodnocení spoligotypizace



# Profily izolátů *M. bovis* z let 1965-2002

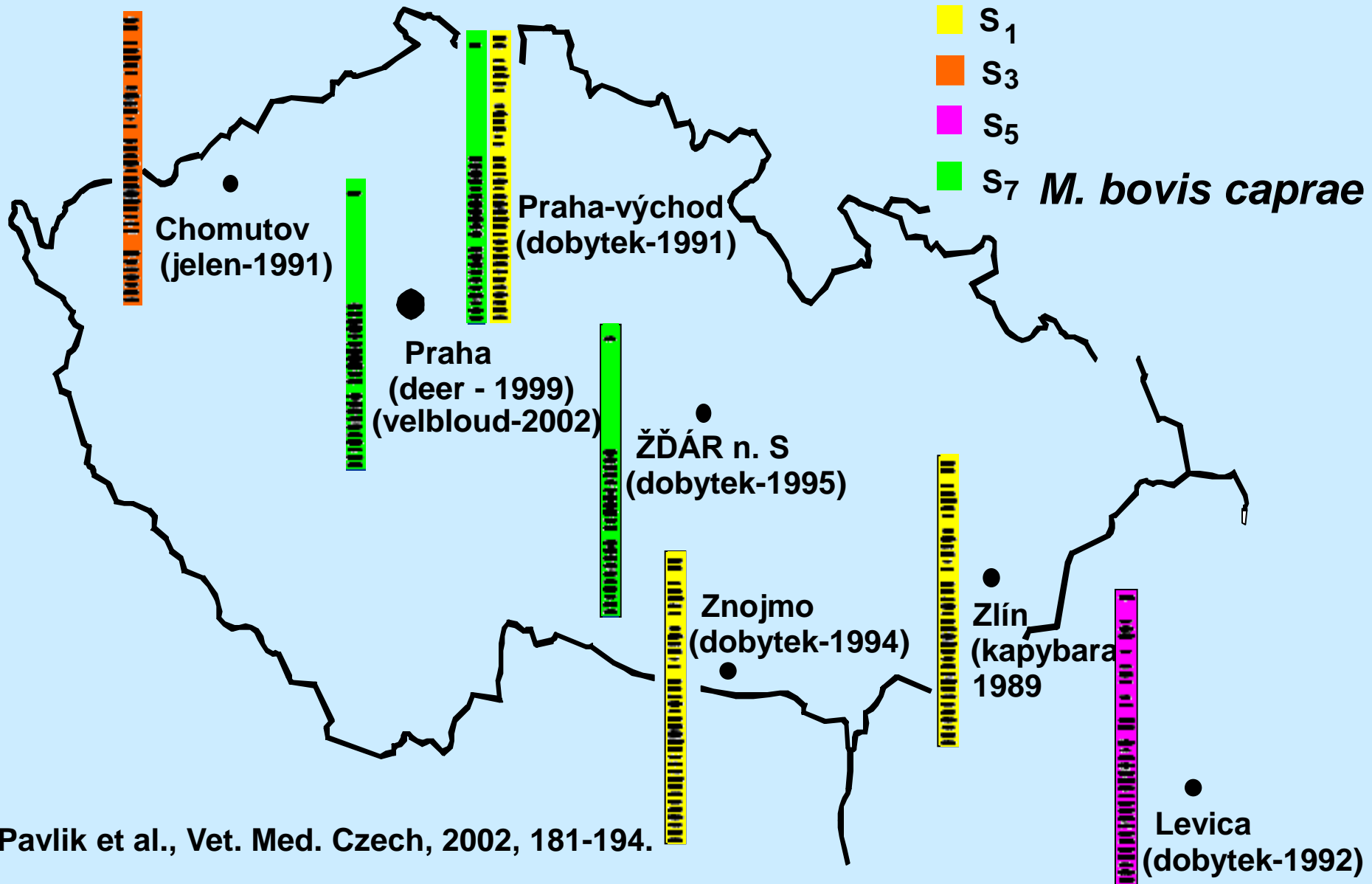


 Nejběžnější typ

 Jedinečný typ

 *M. bovis caprae*

# Spoligotypy izolátů *M. bovis* u zvířat



# ***Vyhodnot'te***



**Proved'te analýzu spoligotypů podle předložené učební pomůcky**

# ***Shrnutí***

- 1) Způsoby provedení hybridizace**
- 2) Hybridizace v roztoku**
- 3) Příprava značených sond**
- 4) Hybridizace na pevném povrchu**
- 5) Southernův přenos**
- 6) Fluorescentní *in situ* hybridizace**
- 7) Příklady využití metod hybridizace v analýze mikroorganismů – RFLP, reverzní hybridizace, spoligotypizace**