

DNA čipy

DNA čip neboli **DNA microarray** je technologie sloužící k analýze variability DNA a funguje na principu **alelově specifické hybridizace**. To znamená, že metoda je založena na principu párování komplementárních bází nukleotidů (spojení vodíkovými můstky). Jedná se o destičku (povětšinou skleněnou nebo silikonovou) s mnoha (běžně desetitisíce, statisíce, výjimečně až miliony) vzorky **jednovláken DNA oligonukleotidů**.

Touto metodou odhalujeme změny v sekvenci DNA, kde nestačí sledovat počet či délku fragmentů DNA, protože nepostihují žádné rozpoznávací místo ani nemají povahu delece nebo inserce.

Pokud známe alespoň částečně sekvence normální a mutované alely, a to přímo v místě mutace, můžeme studovaný vzorek hybridizovat s krátkým značeným syntetickým testovacím oligonukleotidem, který je komplementární k té oblasti genu, která by mohla nést mutaci. K hybridizaci dochází za daných podmínek (teplota, koncentrace solí...) pouze v případě dokonalé sekvenční komplementarity.

Metoda PCR umožnila zvýšení citlivosti a spolehlivosti alelově specifické hybridizace. Testovací oligonukleotidy mohou být hybridizovány nikoliv na kompletní genomovou DNA, ale stačí specificky amplifikované segmenty vyšetřovaného genu, čímž odpadá komplikace nespecifické hybridizace. Sondy (testovací oligonukleotidy) jsou speciálními metodami přichyceny k povrchu destičky pevnou kovalentní vazbou. Na ně je hybridizována směs značených PCR produktů amplifikované DNA.

Výhoda: je možné současné vyšetření obrovského množství sekvenčních variant

Nevýhoda: (prozatím stále) vysoká cena

Jak vypadá DNA čip?

V dnešní době existuje několik firem produkujících DNA čipy komerčně (např. Affymetrix, Agilent Technologies, Eppendorf či Illumina). Čipy jsou vytvářeny i přímo ve výzkumných laboratořích pro vlastní potřebu.

Do skleněné destičky zakotvíme sondy známé sekvence. Na čip je hybridizována amplifikovaná fluorescenčně značená vyšetřovaná DNA a hybridizace této DNA na jednotlivé pozice je detekována čtecím zařízením a počítačem.

Postup metody

Vytvoření DNA čipu

Navázáním oligonukleotidu (sondy) kovalentní vazbou na destičku.

Vytvoření vzorku

Typickým příkladem vzorku je všechna mRNA přítomná v určité buňce v určitém okamžiku. Vzorek musí být nejdříve purifikován ("vyčištěn") např. elektroforézou, PCR se specifickými primery, poté je reversní transkripcí převeden do cDNA. Dále může proběhnout amplifikace pomocí PCR pro zajištění dostatečného počtu molekul požadovaných typů ve vzorku a dělení molekul cDNA na kratší pomocí restričních endonukleáz. Během reverzní transkripce, PCR amplifikace či po nich probíhá nezbytný krok označení molekul. Ke každé molekule je připojeno několik molekul (typicky zhruba jedna na každých 60 bází) fluorescentní (popř. jiné, např. radioaktivní) látky, jejíž přítomnost nebo množství bude možno později detekovat. Typickými fluorescenčními látkami používanými pro tyto pokusy jsou fluorofory. Molekuly vzorku jsou před aplikací na čip denaturovány. Výsledným vzorkem je tedy směs jednovláken DNA označených detekovatelnou látkou.

Hybridizace vzorku s čipem

Po kontaktu s DNA čipem molekuly vzorku hybridizují s komplementárními sondami.

Omytí čipu

Po omytí zůstanou na čipu sondy, pevně přichycené kovalentní vazbou k jeho povrchu a molekuly vzorku přichycené dostatečně pevně na sondách. Molekuly vzorku přichycené na sondách nedostatečným počtem vodíkových můstků, tedy nedostatečně sekvenčně podobné, jsou odplaveny.

Skenování čipu

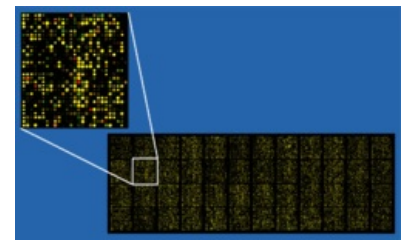


2 Affymetrix čipy

Po excitaci laserem vyzáří molekuly barviva přítomné na molekulách vzorku přichycených na sondách světlo určité vlnové délky. Světlo vyzářené každou vlastností je detekováno.

Zpracování výsledků

Předchozím postupem získáme informaci o tom, ke kterým sekvencím uchyceným na čipu existovaly komplementární sekvence ve vzorku. Podle intenzity vyzářeného světla lze určit i množství komplementárních molekul přítomných ve vzorku, běžně se ovšem pracuje pouze s relativním množstvím. Jsou tedy pouze porovnávána množství světla vyzářená jednotlivými vlastnostmi pro zjištění poměrů, v jakých byly jednotlivé sekvence ve vzorku přítomny. Zjištění absolutní koncentrace jednotlivých sekvencí ve vzorku je problematické.



Dvoukanálový DNA čip

Další techniky

- ARMS (amplification refractory mutation system) - pokud primer nehybridizuje na svém 3' konci dokonale, nedochází vůbec k amplifikaci
- LCR (ligase chain reaction)
- OLA (oligonucleotide ligation assay)

Odkazy

Související články

- Hybridizace in situ

Použitá literatura

- GOETZ, Petr, et al. *Vybrané kapitoly z lékařské biologie: díl 2*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2002. 139 s. ISBN 80-246-0320-9.
- Wikipedie: Otevřená encyklopedie. *DNA čip* [online]. [cit. 2012-01-22]. <https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=DNA_%C4%8Dip&oldid=7008557>.
- Wikipedia: The Free Encyclopedia. *DNA microarray* [online]. [cit. 2012-01-22]. <https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=DNA_microarray&oldid=471860388>.