

Metody analýzy nukleových kyselin

Analýza nukleových kyselin je založena na dvou zásadních přístupech:

- množení DNA: v živých organismech nebo in vitro chemickým procesem (PCR)
- molekulární hybridizace

Aplikace:

- analýza struktury genu, mapování, funkce
- analýza geneticky podmíněných onemocnění
- prenatální diagnostika
- detekce nosičů mutovaných alel
- diagnostika a patogeneze onemocnění
- biosyntéza – insulin, růstový hormon...
- léčba genetických onemocnění – genová terapie
- základní objev pro rozvoj

Selektivní namnožení specifických fragmentů DNA z genomové DNA nebo cDNA. Amplifikaci je možné provádět *in vivo* nebo *in vitro* pomocí DNA-polymerasy

Množení uvnitř hostitelských buněk

Díky objevení enzymů – restrikčních endonukleas – bylo umožněno získat **různě dlouhé fragmenty**, které mohou být dále analyzovány. Samotné množení je založeno na tvorbě rekombinantních molekul DNA, které vznikají spojením různých úseků molekul DNA pocházejících z taxonomicky odlišných druhů. Další důležitá DNA molekula nezbytná pro množení DNA, je tzv. vektor, do kterého je fragment DNA vložen. Rekombinovaný vektor je poté vnesen do hostitelského organismu, např. bakterie.

Restrikční endonukleasy

Restrikční endonukleasy jsou **enzymy** izolované z bakterií, které **štěpí dvouvláknovou DNA** ve specifických sekvencích. Enzymy chrání bakterie před vniknutím cizorodé DNA. Endonukleasy štěpí DNA tak, aby vznikaly přecházející úseky tzv. **kohezní** nebo **lepivé konce** a fragmenty DNA, které mají definovanou délku. Většinou jde o **palindromy**.

Restrikční endonukleasy mohou štěpit rekombinantní molekuly DNA za účasti enzymu **DNA-ligasy** a komplementarity mezi lepivými konci, např. enzym EcoRI izolovaný z E. coli štěpí sekvenci GAATTC Restriktasy jsou třeba k získání dostatečného množství DNA.

Vektory

- Plasmidy – vyskytují se u bakterií
- Lambda (λ) fág – patří mezi bakteriofágy
- Kosmidy – kombinace DNA plasmidu a lambda fága
- Umělé kvasinkové chromosomy – možnost klonovat velmi dlouhé fragmenty (až 2Mpb)
- Bakteriální umělé chromosomy

Sekvenace DNA - Sangerova metoda

Základní metodou analýz DNA je **sekvenace DNA - určení pořadí nukleotidů v DNA**.

Byly vyvinuty dvě metody - Sangerova (dideoxy chain termination method) a Maxam-Gilbertova metoda (chemické degradace).

Sangerova metoda

Nejčastěji používaná.

Základem je použití **směsi standardních deoxynukleotidtrifosfátů** (dNTPs) a **modifikovaných dideoxynukleotidtrifosfátů** (ddNTPs) při přípravě úseku DNA, který bude sekvenován. Modifikovaný ddNTPs má za následek ukončení syntézy DNA. Výsledkem **syntézy DNA** je série různě dlouhých molekul DNA, které se v délce liší vždy o **jeden nukleotid**.

Celý proces probíhá ve 4 separátních enzymových reakcích. Každá obsahuje - **templátovou DNA** v jednovláknové podobě, **DNA-polymerasu**, **primer**, 4 **dNTPs** a modifikovaný nukleotid **dideoxynukleotidtrifosfát** (ddNTPs). V každé ze 4 reakcí je jiný ddNTP - ddATP, ddGTP, ddCTP, nebo ddTTP.

Po skončení sekvenace jsou molekuly DNA **separovány kapilární elektroforézou** - produkty procházejí kapilárou, kde se dělí dle velikosti. Jestliže je do sekvenační reakce přidán dNTP označený **radioaktivně** - je možné vzniklou DNA detekovat na **rtg filmu** v podobě viditelných pruhů **všech 4 linií**.

Množení DNA in vitro - polymerasová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce, tzv. PCR, je mnohokrát opakovaná replikace DNA *in vitro* s tím, že každá replikovaná molekula DNA slouží jako templát: denaturovaná DNA → nasednutí primeru → syntéza DNA.

 *Podrobnější informace naleznete na stránce PCR.*

Hybridizace nukleových kyselin

Hybridizace NK = spojování podle pravidel párování bazí.

Spočívá v denaturaci dvoušrobovice DNA a následné renaturaci. Může nastat mezi dvěma vlákny DNA, DNA a RNA, nebo RNA a RNA. Na základě hybridizace můžeme k detekci komplementární sekvence nukleové kyseliny použít sondu.

Sonda

Molekula DNA nebo RNA, která může být na základě hybridizace využita k detekci **komplementární sekvence** nukleové kyseliny.

Musí být použity v **jednovláknové podobě** a označené tak, aby bylo možné hybridizační reakci zviditelnit.

Jako sondy mohou být využity - **klonované sekvence DNA**, sekvence **získané PCR**, syntetické **oligonukleotidy**, RNA získané transkripcí **klonované DNA** in vitro.

Southern blotting

Základem je izolace a purifikace DNA, následné štěpení restriční enzymem za vzniku tisíců různě velkých fragmentů. Dalším krokem je elektroforetické rozdělení podle velikosti fragmentů. Poté je gel ponořen do alkalického roztoku, díky kterému se DNA denaturuje. Následuje blotting, což je přenesení denaturovaných fragmentů na membránu, která je vystavena teplotě 80 °C a fragmenty se na ní fixují. Pak nastává vlastní hybridizace.

 *Podrobnější informace naleznete na stránce Southern blotting.*

Northern blotting

Jedná se o podobnou techniku jako Southern blotting, ale analyzovanou kyselinou je RNA.

Technologie mikročipů

DNA mikročip je obvykle skleněná destička, na které jsou připojeny tisíce různých sekvencí DNA v určitém pořadí. Tyto molekuly slouží jako sondy k hybridizaci s testovacími vzorky. Využití technologie mikročipů:

- Analýza genové exprese – srovnání exprese v buňkách a tkáních za různých situací (nádorové buňky)
- Analýza genotypu – určení, zda je jedinec homozygot nebo heterozygot pro daný polymorfismus
- Genetické testování – identifikace nosiče mutace, diagnostika dědičného onemocnění

Odkazy

Související články

- Southernův blotting
- DNA
- PCR
- Denaturace nukleových kyselin, molekulární hybridizace

Zdroj

- KOHOUTOVÁ, Milada, et al. *Lékařská biologie a genetika. (II. díl)*. 1. vydání. Praha : Karolinum, 2012. ISBN 978-80-246-1873-9.
- ŠTEFÁNEK, Jiří. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. [cit. 11. 2. 2010]. <<https://www.stefajir.cz/>>.

