

MOLEKULÁRNE METÓDY AKTUÁLNE POUŽÍVANÉ V KLINICKEJ GENETIKE

RNDr. Andrea Pastoráková, PhD., RNDr. Robert Petrovič, PhD.

2016

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta

MOLEKULÁRNE METÓDY AKTUÁLNE POUŽÍVANÉ V KLINICKEJ GENETIKE

**Vysokoškolská učebnica pre pregraduálne a postgraduálne štúdium na
lekárskych fakultách**

RNDr. Andrea Pastoráková, PhD., RNDr. Robert Petrovič, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta

© RNDr. Andrea Pastoráková, PhD. a RNDr. Robert Petrovič, PhD.
Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta, 2016

Recenzenti: prof. RNDr. Vanda Repiská, PhD.
doc. MUDr. Ján Chandoga, CSc.

Všetky práva vyhradené. Toto dielo ani žiadnu jeho časť nemožno reprodukovať, ukladať do informačných systémov alebo inak rozširovať bez písomného súhlasu majiteľov autorských práv.

ISBN 978-80-223-4231-5

Obsah

	Predhovor	3
1.	Izolácia nukleových kyselín	4
1.1	Izolácia DNA	4
1.2	Izolácia RNA	5
2.	Stanovenie kvantity a kvality nukleových kyselín	8
2.1	Spektrofotometrická kvantifikácia nukleových kyselín	8
2.2	Kvantifikácia s použitím fluorescenčných farbív	8
2.2.1	Využitie migrácie nukleovej kyseliny v géli s jej následnou fluorescenčnou detekciou	8
2.2.2	Využitie kvantifikácie množstva nukleových kyselín použitím real-time PCR metódy	9
2.2.3	Kvantifikácia fluorospektrofotometrom (fluorimetrom)	9
3.	PCR (polymerázová reťazová reakcia)	11
3.1	Najdôležitejšie PCR komponenty	11
3.2	Variácie PCR	13
3.3	Kvantitatívna PCR (qPCR)	16
3.3.1	Kvantifikácia pomocou qPCR	18
3.3.2	Určenie genotypu metódou alelovej diskriminácie a analýzou krivky topenia (HRM)	20
4.	Elektroforetická separácia nukleových kyselín	23
4.1	Vizualizácia DNA	25
4.2	RFLP	25
4.3	VNTR a STR	27
5.	MLPA	29
6.	Sekvenovanie	33
6.1	Chemická metóda	33
6.2	Sangerova metóda	33
6.3	Next Generation Sequencing (NGS)	35
6.3.1	Sekvenovanie druhej generácie	35
6.3.2	Sekvenovanie tretej generácie	36
7.	Fragmentačná analýza DNA	37
8.	Metódy založené na princípe hybridizácie	39
8.1	Southern blot	39
8.2	FISH (fluorescent in situ hybridization)	40
8.3	DNA Microarray (DNA mikročip, biočip)	47

Predhovor

Genetika prekonala v posledných desaťročiach obrovský pokrok. Začiatok predstavoval zavedenie cytogenetických metód, pokračovanie v podobe osekvenovania celého ľudského genómu, čo viedlo v súčasnosti k možnosti masívneho paralelného sekvenovania jednotlivcov metódou sekvenovania novej generácie vedúceho k získaniu rádovo tisícov až miliónov sekvencií naraz. Cieľ ako aj spôsob spracovania predloženého textu je zameraný na potreby pregraduálneho a postgraduálneho štúdia medicínskej komunity. Nové laboratórne metódy, prístrojové vybavenie a predovšetkým molekulárno-genetický pokrok sa preniesol do medicínskej praxe s prenikaním do takmer všetkých medicínskych špecializácií. Preto je nevyhnutné, aby si študenti a lekári tieto nové poznatky a trendy osvojili a následne ich dokázali využívať v klinickej praxi. Publikácia sumarizuje a vysvetľuje molekulárno-genetické metódy, ktoré sú v súčasnosti využívané za účelom genetickej diagnostiky.

Autori

1. Izolácia nukleových kyselín

1.1 Izolácia DNA

Prvú izoláciu DNA uskutočnil v roku 1869 švajčiarsky vedec Friedrich Miescher. Izolácia DNA je kľúčovým krokom pre množstvo následných aplikácií v oblasti molekulovej biológie a lekárskej genetiky. Najčastejším a najdostupnejším materiálom vhodným na izoláciu ľudskej genómovej DNA sú leukocyty krvi. DNA je možné získať aj z iných tkanív a telesných tekutín, ako sú napríklad svaly, koža, kosti, zuby, sperma, sliny, moč, plodová voda atď. Metód izolácie genómovej DNA je viacero. Výber závisí od technického vybavenia laboratória, časových a finančných možností ako aj od materiálu, z ktorého sa DNA izoluje, od podmienok jej uskladnenia a od množstva potrebného na analýzu. Najviac využívaným zdrojom DNA je periférna krv, preto sa zameriame na extrakčné protokoly z tohto materiálu. Existujú viaceré metódy na izoláciu DNA, ktoré majú však spoločné kroky:

- 1) rozrušenie bunkovej membrány a lýza buniek;
- 2) denaturácia nukleoproteínového komplexu;
- 3) inaktivácia nukleáz a ďalších bunkových enzýmov;
- 4) DNA precipitácia.

Lýza buniek sa dosahuje použitím detergentov a enzýmov. Sodná soľ dodecylsulfátu (SDS), TritonTMX-100 sú príklady bežných detergentov solubilizujúcich bunkovú membránu. Spolu s detergentom sa často pridávajú enzýmy, a to za účelom štiepenia glykoproteínov a inaktivácie DNáz. Bunkové **DNázy** sú enzýmy, ktoré štiepia DNA a tým znehodnocujú a znižujú výťažok a kvalitu nukleových kyselín.

Precipitácia DNA z roztoku prebieha pridaním vysokej koncentrácie soli (napr. octan amónny) a za prítomnosti rozpúšťadiel (napr. etanol v konečnej koncentrácii 70-80%; alebo izopropanol v konečnej koncentrácii 40-50%).

Niektoré protokoly pokračujú premytím DNA precipitátu 70% etanolom, čím dôjde k zbaveniu sa nadbytočných solí. Nakoniec sa DNA rozpustí vo vode alebo v pufrí napr. TE (pozostávajúcom z 10mM Tris, 1mM EDTA-kyselina etyléndiamintetraoctová). TE pufr sa používa pre dlhodobé uskladnenie DNA, pretože zabraňuje degradácii DNA nukleázami, nevhodným pH, ťažkými kovmi a oxidáciou voľnými radikálmi; Tris udržiava vhodné pH 7-8 a EDTA viaže dvojmočné ióny (ako Mg^{2+} a Ca^{2+} , ktoré sú potrebné pre funkciu DNáz), ako aj bráni oxidačnému poškodeniu ťažkými kovmi.

Postup izolácie DNA je viacero, výber závisí od následného použitia, nárokov na kvantitu a kvalitu, technického vybavenia laboratória a potreby uskladnenia pre budúce použitie. Sú to najmä:

1) Príprava a použitie hrubého lyzátu, kde je prítomná DNA. Táto „rýchla a špinavá“ metóda pozostáva z lýzy buniek pri vysokej teplote (90°C 20minút) alebo je uskutočnená proteínázou K. Lyzát sa použije priamo v ďalších aplikáciách. Prítomnosť kontaminantov v lyzáte obmedzuje jeho použitie, ako aj skladovanie DNA.

2) Vysol'ovacie metódy začínajú prípravou hrubého lyzátu, pokračujú tzv. vysol'ovaním, kedy sa proteíny a iné kontaminanty precipitujú pri vysokej koncentrácii soli (octan draselný; octan amónny), precipitát je eliminovaný centrifugáciou a DNA sa získava z roztoku následnou alkoholovou precipitáciou. Výťažok DNA a jej čistota varíruje podľa použitej metodiky.

3) Organická extrakcia využíva organické rozpúšťadlá na odstránenie kontaminantov z bunkového lyzátu. Bunky sú lyzované použitím detergentov, lyzát sa zmieša so zmesou fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Centrifugáciou zmesi sa docíli oddelenie dvoch vrstiev organickej vrstvy (fázy) obsahujúcej kontaminanty a vodnej vrstvy (fázy) s DNA. Zo získanej vodnej fázy sa DNA izoluje najčastejšie alkoholovou precipitáciou. Organická extrakcia bola veľmi využívaná v laboratóriách v minulosti, v súčasnosti je málo používaná na rutinnú diagnostiku, jednak pretože je časovo náročná,

DNA môže obsahovať fenol/chloroform, ktoré inhibujú enzymatické reakcie a táto metóda nie je vhodná ani na izoláciu v automatoch.

4) Centrifugácia v gradiente chloridu cézneho (CsCl) umožňuje získať genómovú DNA vysokej kvality, avšak táto metóda je časovo náročná, prácna, drahá (potrebná ultracentrifúga) a nepoužiteľná v automatoch, nie je rutinne využívaná. Bunkový lyzát je precipitovaný alkoholom, DNA roztok je zmiešaný s CsCl a etídiumbromidom, nasleduje niekoľkohodinová centrifugácia v ultracentrifúge. DNA je viditeľná v podobe prúžku, po jej odobratí sa extrahuje izopropanolom, aby došlo k odstráneniu etídiumbromidu a precipituje sa etanolom.

5) Minikolónová (kolónková) purifikácia využíva schopnosť materiálu v minikolóne (matrix, matrica) adsorbovať DNA za určitých konkrétnych podmienok pH a koncentrácie soli (obr. 1). Existujú viaceré typy materiálov viažucich DNA, ktoré sú na účely izolácie DNA umiestnené v minikolóne: hydrofilné matrice viažuce vodík v prítomnosti chaotropných činidiel, matrice využívajúce výmenu iónov (iónomeničové), matrice s určitou afinitou a veľkostnou selekciou.

Väčšina minikolónových metód má podobný postup: na začiatku prebehne lýza buniek, potom nasleduje DNA adsorpcia na matricu centrifugovateľných minikolón, premytie nukleovej kyseliny adsorbovanej na matricu v minikolóne, čím dôjde k zbaveniu sa kontaminantov a finálna elúcia (uvolnenie) DNA.

Kremičitanové (SiO_2 , Silika) matrice majú vynikajúcu schopnosť viazať DNA, pretože sú kladne nabité a majú vysokú afinitu k negatívne nabitej DNA. V prostredí vysokej koncentrácie chaotropných solí dôjde k adsorpcii DNA na kremičitanovú matricu (silica gél), zatiaľ čo bunkové proteíny a iné metabolity zostanú v roztoku a následne sú vymyté z kolóny. DNA vhodná na diagnostické použitie je získaná elúciou zo silika matrice použitím pufru s nízkou koncentráciou solí (TE, destilovaná voda). Existuje množstvo komerčne prístupných kitov (súprav), ktoré obsahujú všetky potrebné chemikálie a minikolóny. Izolácia DNA prostredníctvom kitu založenom na silika materiáli trvá od 40-60 minút, pričom sa získava vysokokvalitná DNA vo vysokom výťažku. Dnes sú k dispozícii kity vhodné na poloautomatizovanú alebo plnoautomatizovanú izoláciu DNA (obr. 3).

Ďalšou možnosťou je použiť DNA izolačný kit využívajúci magnetické guľôčky, ktoré sú pokryté materiálom viažucim DNA (polyméry, silika, hydroxyapatit). DNA sa naviaže na magnetické guľôčky a prostredníctvom magnetickej sily magnetu je možné premývať naviazanú DNA. V tomto prípade nie je potrebné použiť centrifugáciu.



Obr. 1. Minikolóna a postup izolácie DNA

1.2 Izolácia RNA

Získanie RNA vysokej kvality je prvým a často najkritickejším krokom pre molekulárne techniky typu kvantifikácie expresie určitého génu metódou real-time PCR (RT-qPCR), analýzy transkriptómu sekvenovaním ďalšej generácie (NGS), analýzy RNA profilu mikročipmi, northern analýzy a konštrukcie cDNA knižnice. Pre dosiahnutie čo najcitlivejších a biologicky

najrelevantnejších výsledkov je potrebné dodržať pracovné postupy pred, počas a po RNA purifikácii. Pre optimalizáciu RNA izolácie a analýzy sú dôležité nasledovné kroky:

- 1) manipulácia so vzorkami určenými na RNA izoláciu;
- 2) výber metódy izolácie RNA;
- 3) uskladnenie RNA.

Klasická izolácia RNA prebieha väčšinou v prítomnosti inhibítorov ribonukleáz. Ribonukleázy (RNázy) sú bunkové enzýmy degradujúce RNA. Inhibítory RNáz sú silné denaturanty, ktoré vo vzorke znižujú riziko RNA degradácie (napr. guanidínové soli, dodecylsulfát sodný - SDS, chemikálie obsahujúce fenol).

Pred vlastnou izoláciou RNA je potrebné sterilizovať všetok materiál (skúmavky, špičky, pipety, vodu, laboratórny priestor) (obr. 2), ktorý bude v kontakte so vzorkou určenou na izoláciu RNA. Kým sa vzorka začne spracovávať, udržiava sa v tekutom dusíku, na suchom ľade alebo je vložená do špeciálnych stabilizačných roztokov (napr. RNeasy®), alebo špeciálnych skúmaviek so stabilizačným roztokom napr. PAXgene® Blood RNA Tube.

Existuje niekoľko **spôsobov izolácie RNA**:

1) Organická extrakčná metóda je zlatým štandardom izolácie RNA. Na začiatku izolácie sa vzorka homogenizuje v roztoku obsahujúcom fenol (TRIzol®, RNeasy® RT), následne sa centrifuguje. Počas centrifugácie dochádza vo vzorke k separácii troch vrstiev: **spodnej organickej fázy**, **strednej fázy** obsahujúcej denaturované proteíny a genómovú DNA a **vrchnej vodnej fázy** s RNA. Po odobratí vrchnej fázy sa RNA z nej precipituje (vyzráža) alkoholom a následne sa rehydratuje.

2) Minikolónová metóda (filtračná) využíva membrány (zo sklenených vlákien, silika alebo iónomeničové membrány) vložené do minikolón. Vzorka je lyzovaná v pufrí obsahujúcom RNázové inhibítory, nukleové kyseliny sa naviažu na membránu, keď lyzát prechádza membránou počas centrifugácie. Membrána s naviazanou RNA je viackrát premývaná. RNA sa získa centrifugáciou do novej skúmavky po elúcii vhodným elučným roztokom.

3) Metóda využívajúca magnetické partikuly obsahujúce paramagnetické vnútro obklopené obalom modifikovaným tak, aby viazal žiaduci objekt, teda RNA. Vzorka lyzovaná v roztoku obsahujúcom RNázové inhibítory sa zmieša s magnetickými partikulami, kedy dôjde k naviazaniu RNA na povrch magnetických partikul. Opakovaným použitím externého magnetického poľa je možné vychytať magnetické partikuly s naviazanou nukleovou kyselinou, odstránením magnetického poľa zase uvoľniť a resuspendovať v premývacích roztokoch. Na záver sa RNA uvoľní do elučného roztoku a magnetické partikuly sa odstraňujú.

4) Priama lýza sa používa na prípravu vzorky použitím lyzačných roztokov, ktoré lyzujú vzorku, stabilizujú nukleové kyseliny a takto pripravená RNA môže byť použitá na ďalšie analýzy. Priama lýza teda nie je purifikačná metóda v pravom zmysle slova.

Získanú RNA je potrebné **kvantifikovať**. Ide o dôležitý a nevyhnutný krok, ktorý predchádza RNA analýzu. Existujú viaceré možnosti kvantifikácie nukleových kyselín, ktorým je venovaná samostatná časť.

Skladovanie RNA - RNA musí byť resuspendovaná resp. eluovaná v roztoku bez RNáz, na tento účel sú komerčne dostupné viaceré roztoky na skladovanie RNA, zabezpečujúce maximálnu ochranu pred RNázami. RNA sa odporúča skladovať pri teplote – 80°C v alikvótoch (rozpipetovaná v menších množstvách v mikroskúmavkách) určených na jedno použitie.



Obr. 2. Laminárny box na izoláciu nukleových kyselín, prácu s DNA, RNA atď.



Obr. 3. Automatický pipetovací robot, napr. na izoláciu 96 vzoriek DNA.

2. Stanovenie kvantity a kvality nukleových kyselín

Dôležité je určenie koncentrácie a čistoty izolovanej DNA a RNA, pretože analýzy, ktoré nasledujú po izolácii nukleových kyselín často vyžadujú presné množstvo a čistotu nukleových kyselín (NK bez prímiesi). Metód kvantifikácie NK je niekoľko, najpoužívanejšie sú spektrofotometrická kvantifikácia a kvantifikácia UV fluorescenciou za prítomnosti farbičky.

2.1 Spektrofotometrická kvantifikácia nukleových kyselín

Nukleové kyseliny špecificky absorbujú ultrafialové svetlo. Vzorka s NK je v spektrofotometri (obr. 6) vystavená ultrafialovému svetlu o vlnovej dĺžke 260nm, fotodetektor následne zmeria svetlo, ktoré prejde vzorkou; čím viac svetla vzorka pohltí (absorbuje), tým je vyššia koncentrácia nukleovej kyseliny vo vzorke. Výpočet koncentrácie NK závisí od toho, či ide o DNA alebo RNA, či je jednovláknová alebo dvojvláknová.

dsDNA: $c = A_{260}/0.02$ [$\mu\text{g/ml}$]

ssDNA: $c = A_{260}/0.027$ [$\mu\text{g/ml}$]

RNA: $c = A_{260}/0.025$ [$\mu\text{g/ml}$]

Teda, ak absorbanca dsDNA je 1, koncentrácia DNA vo vzorke je 50 $\mu\text{g/ml}$ (pozn. v prípade, ak je dráha lúča 1cm).

Pokiaľ poznáme sekvenciu napr. pri syntéze primeru (ssDNA), môžeme z nej vypočítať molekulovú hmotnosť a určiť priamo molárnu koncentráciu nukleovej kyseliny ($\text{pmol}/\mu\text{l}$)

$c = A_{260} * (100/[1.5*A + 0.71*C + 1.2*G + 0.84*T])$ [$\text{pmol}/\mu\text{l}$]

A je počet adenínov (v skutočnosti dATP), C je počet cytozínov (dCTP), G je počet guanínov (dGTP) a T počet tymínov (dTTP).

Predpokladom pre správne určenie koncentrácie na základe absorbancie je samozrejme čistota nukleovej kyseliny vo vzorke. Čistota NK sa určuje podľa absorbčnej krivky, poprípade zjednodušene na základe pomeru absorbancií pri 260 a 280 nm, pretože proteíny absorbujú svetlo vlnovej dĺžky 280nm. Čistá DNA má pomer absorbancií 260/280 ($A_{260/280}$) pohybujúce sa okolo 1,8; čistá RNA má pomer absorbancií $A_{260/280}$ približne 2.

Vzorku nukleových kyselín môžu okrem proteínov kontaminovať aj ďalšie látky ako je fenol, ktorý sa často využíva pri izolácii NK. Takto izolované vzorky nukleových kyselín nekontaminované fenolom by mali mať $A_{260/280}$ okolo 2. Ďalšie kontaminanty sa zisťujú absorpciou svetla pri 230 nm a 330 nm.

2.2 Kvantifikácia s použitím fluorescenčných farbív

Ďalšou možnosťou ako zmerať koncentráciu nukleových kyselín je zmeranie fluorescencie farbiva (napr. etidiumbromid), ktoré sa viaže na nukleovú kyselinu a selektívne svieti v prípade, že je naviazané na NK. Metóda využitia fluorescenčného farbiva naviazaného na NK sa používa v prípade, ak je koncentrácia NK príliš nízka na kvantifikáciu spektrofotometrom, ako aj v prípade že je NK kontaminovaná látkou (kontaminantom) absorbujúcim svetlo vlnovej dĺžky 260nm.

2.2.1 Využitie migrácie nukleovej kyseliny v géli s jej následnou fluorescenčnou detekciou

Ak predpokladáme nízku koncentráciu NK, na jej zistenie použijeme elektroforetickú migráciu NK v géli (môže sa použiť agarózový alebo polyakrylamidový gél), fluorescenčné farbivo je buď primiešané do vzorky NK alebo priamo do gélu. Spolu so vzorkou NK neznámej koncentrácie migruje v géli vo vedľajšej dráhe vzorka NK so známou koncentráciou. Na základe porovnania fluorescencie (po vystavení gélu s NK svetlu o konkrétnej vlnovej dĺžke) vzorky so známou

koncentráciu a vzorky neznámej koncentrácie sa urobí odhad, resp. sa výsledok kalkuluje počítačovým softvérom denzitometricky (obr. 4).

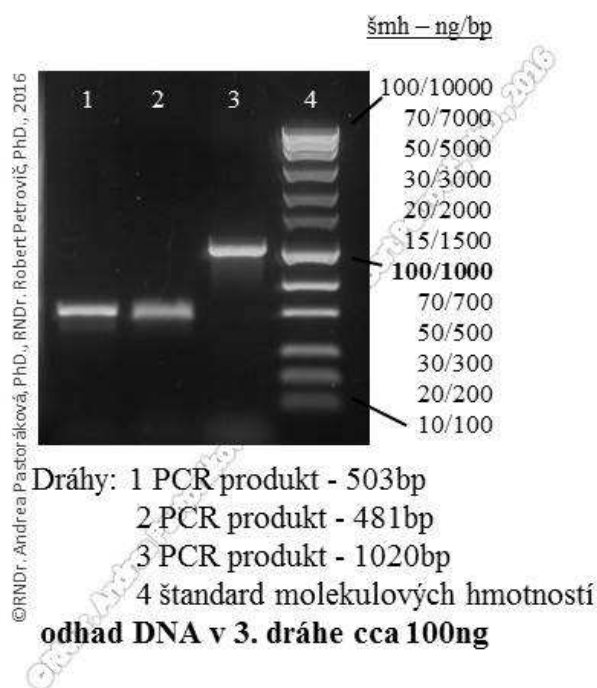
2.2.2 Využitie kvantifikácie množstva nukleových kyselín použitím real-time PCR metódy

V prípade veľmi malého množstva NK, ktoré nie je možné kvantifikovať ani gélovou elektroforézou, resp. potrebujeme zistiť koncentráciu NK veľmi presne u malého množstva NK (napr. pre kriminalistiku), použije sa metóda absolútnej kvantifikácie prostredníctvom **real-time PCR (kvantifikačnej PCR, qPCR)**. Princíp metódy spočíva v porovnaní amplifikácie určitého úseku nukleovej kyseliny vo vzorke neznámej koncentrácie s amplifikáciou tej istej sekvencie vo vzorke presne definovanej koncentrácie (obr. 5). qPCR je možné kvantifikovať koncentráciu rádovo v pg/ul.

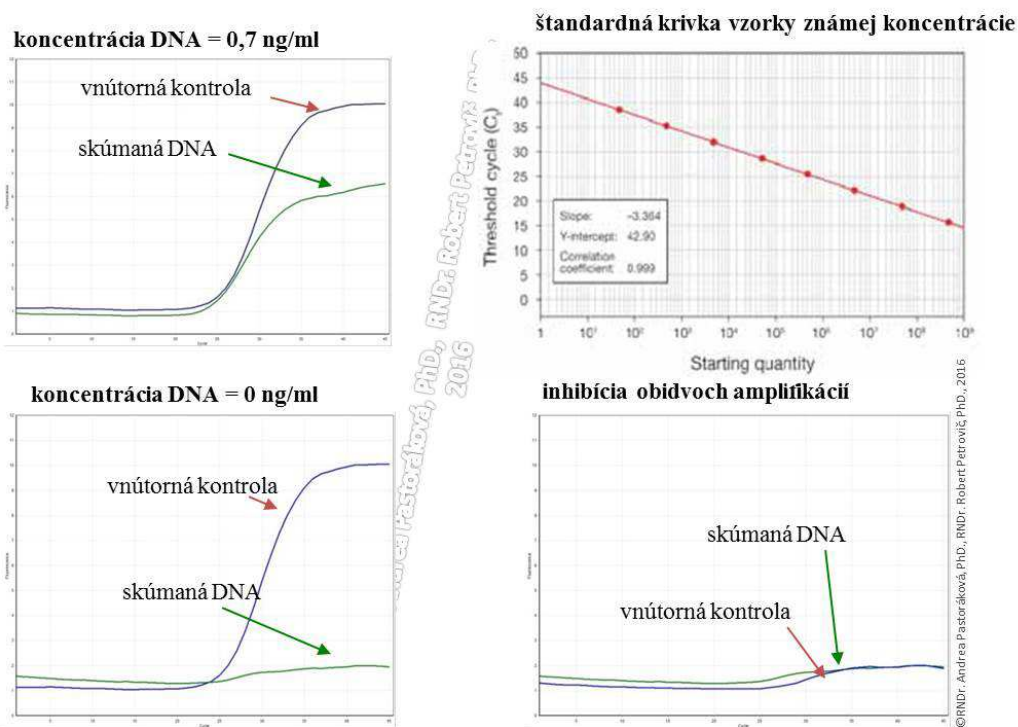
2.2.3 Kvantifikácia fluorospektrofotometrom (fluorimetrom)

Ak máme dostatočné množstvo vzorky, je možné na kvantifikáciu použiť fluorospektrofotometer, v tomto prípade je vzorka zmiešaná s fluorescenčným farbivom a je meraná emitovaná fluorescencia, z ktorej sa vypočíta koncentrácia.

Moderné spektrofotometre a fluorimetre sú konštruované tak, aby na meranie bolo použité minimálne množstvo vzorky NK (napr. pre prístroje NanoDrop je potrebný len 0,5-1 µl vzorky). Pre porovnanie NanoDrop spektrofotometer (NanoDrop 2000c) je schopný zmerať koncentrácie od 0.4 to 15 000 ng/µL dsDNA, NanoDrop fluorospektrometer 0,05 do 2000 pg/µL. Spektrofotometre a fluorofotometre sú po meraní schopné vďaka softvérovému vybaveniu vypočítať nielen koncentráciu ale aj čistotu vzorky (<http://www.nanodrop.com>).



Obr. 4. Kvantifikácia nukleovej kyseliny porovnaním s fragmentom podobnej dĺžky a známej koncentrácie (po migrácii v agarózovom géli v jednosmernom elektrickom prúde a následnej fluorescenčnej detekcii) - odhad DNA v 3. dráhe cca 100ng porovnaním s 1000bp fragmentom štandardu molekulových hmotností (šmh).



Obr. 5. Absolútna kvantifikácia DNA prístrojom real-time PCR cyklérom porovnaním amplifikácie úseku DNA v skúmanej vzorke s amplifikáciou vzorky so známou kvantitou. Okrem amplifikácie skúmanej vzorky je treba urobiť štandardnú krivku amplifikácie vzorky známej koncentrácie, z ktorej sa koncentrácia skúmanej vzorky odčíta. V kriminalistike sa bežne používa pridanie vnútornej kontroly ku vzorke na určenie čistoty vzorky (v prítomnosti inhibítorov nedôjde k amplifikácii žiadnej DNA). Vnútna kontrola je už prítomná v kite, čiže sa automaticky pridáva pri príprave vzoriek na qPCR amplifikáciu, slúži na zistenie prítomnosti inhibítorov v skúmanej vzorke, teda v prípade, že nedôjde k amplifikácii vo vzorke, slúži na rozlíšenie, či je koncentrácia DNA príliš nízka alebo sú vo vzorke prítomné inhibítory. Bežná medicínska molekulárno-genetická diagnostika nevyžaduje prítomnosť vnútornej kontroly, keďže nukleové kyseliny sú prevažne izolované kitmi z krvi, čiže je zabezpečená vysoká kvalita a čistota naizolovanej NK



Obr. 6. Spektrofotometer (NanoPhotometer) a ukážka výsledkou merania koncentrácie RNA izolovanej minikolonovou metódou

3. PCR (polymerázová reťazová reakcia)

Je metóda vyvinutá v roku 1983 Karym Mullisom, ocenená v roku 1993 Nobelovou cenou za chémiu. Polymerázová reťazová reakcia je založená na schopnosti DNA polymerázy syntetizovať nové vlákno DNA podľa templátového vlákna na základe princípu komplementarity. DNA polymeráza je schopná pripájať nukleotidy len k voľnej 3'OH skupine, preto potrebuje primer (čítaj prajmer), ku ktorému je schopná pridávať nukleotidy. Primery sú krátke jednovláknové oligonukleotidy, ktoré umožňujú jednak DNA polymeráze začať so syntézou nového vlákna, na druhej strane ohraničujú špecifickú oblasť, ktorú chceme amplifikovať (namnožiť). Výsledkom PCR reakcie je obrovský počet kópií špecifickej sekvencie (obr. 7). PCR v podstate napodobňuje replikáciu DNA v *in vitro* podmienkach s rozdielom, že nedochádza k replikácii celej DNA ale len vybraného primermi ohraničeného miesta.

3.1 Najdôležitejšie PCR komponenty

Templátová DNA je vzorka DNA obsahujúca cieľovú sekvenciu. Na začiatku reakcie dôjde pri vysokej teplote k denaturácii a separácii jednotlivých vlákien dvojvláknovej DNA.

Enzým DNA polymeráza syntetizuje nové DNA vlákno komplementárne k cieľovej sekvencii. Najčastejšie používanou a prvou DNA polymerázou je *Taq* DNA polymeráza (z termofilnej baktérie *Thermus aquaticus*), zatiaľ čo *Pfu* DNA polymeráza (z *Pyrococcus furiosus*) je preferovaná kvôli tzv. **vysokej fidelite**, čo je schopnosť inkorporovať správnu bázu do novosyntetizovaného vlákna DNA. DNA polymerázy musia mať dve vlastnosti: schopnosť syntetizovať nové vlákno DNA podľa templátovej DNA a byť termostabilné, čiže rezistentné na vysoké teploty (cca 100°C). V súčasnosti sa v laboratóriách často používajú rekombinantné polymerázy s požadovanými vlastnosťami. Napríklad pre PCR, ktorej produkt bude klonovaný, je dôležité použiť polymerázu, ktorá je schopná opraviť vlastnú chybu v prípade inkorporácie nesprávnej bázy pri syntéze nového reťazca. Schopnosť opravovať nesprávne inkorporované bázy počas syntézy nového vlákna DNA sa nazýva tzv. **proofreading** aktivita, ktorá je zabezpečená 3'→5' exonukleázovou aktivitou takejto polymerázy. Pred vlastnou molekulárno-genetickou diagnostikou je treba optimalizovať podmienky PCR reakcie pre konkrétnu DNA polymerázu a pre špecifické primery; treba zistiť optimálnu teplotu annealingu (hybridizácie) primerov, koncentrácie jednotlivých zložiek PCR reakcie (napr. MgCl₂).

Primery sú krátke jednovláknové DNA sekvencie komplementárne k cieľovej sekvencii. DNA polymeráza začína syntetizovať nové vlákno z 3'konca primeru. Dôležitou charakteristikou primerov je teplota topenia (T_m), t. j. teplota, pri ktorej polovica DNA duplexov je disociovaná na jednovláknové molekuly.

Nukleotidy (dNTP, deoxyribonukleotidtrifosfáty) sú stavebné prvky pre novosyntetizovanú DNA molekulu.

Veľmi praktickým riešením pre molekulárno-genetické diagnostické laboratória je tzv. **mastermix**, to je roztok, v ktorom už je prítomné všetko potrebné pre priebeh PCR reakcie, samozrejme okrem primerov a templátovej DNA sekvencie. PCR Master Mix (2X) od firmy ThermoFisher Scientific je jedným z takýchto mixov, obsahuje *Taq* DNA polymerázu, tlmiť roztok (pufor), MgCl₂ a všetky deoxyribonukleotidy trifosfáty.

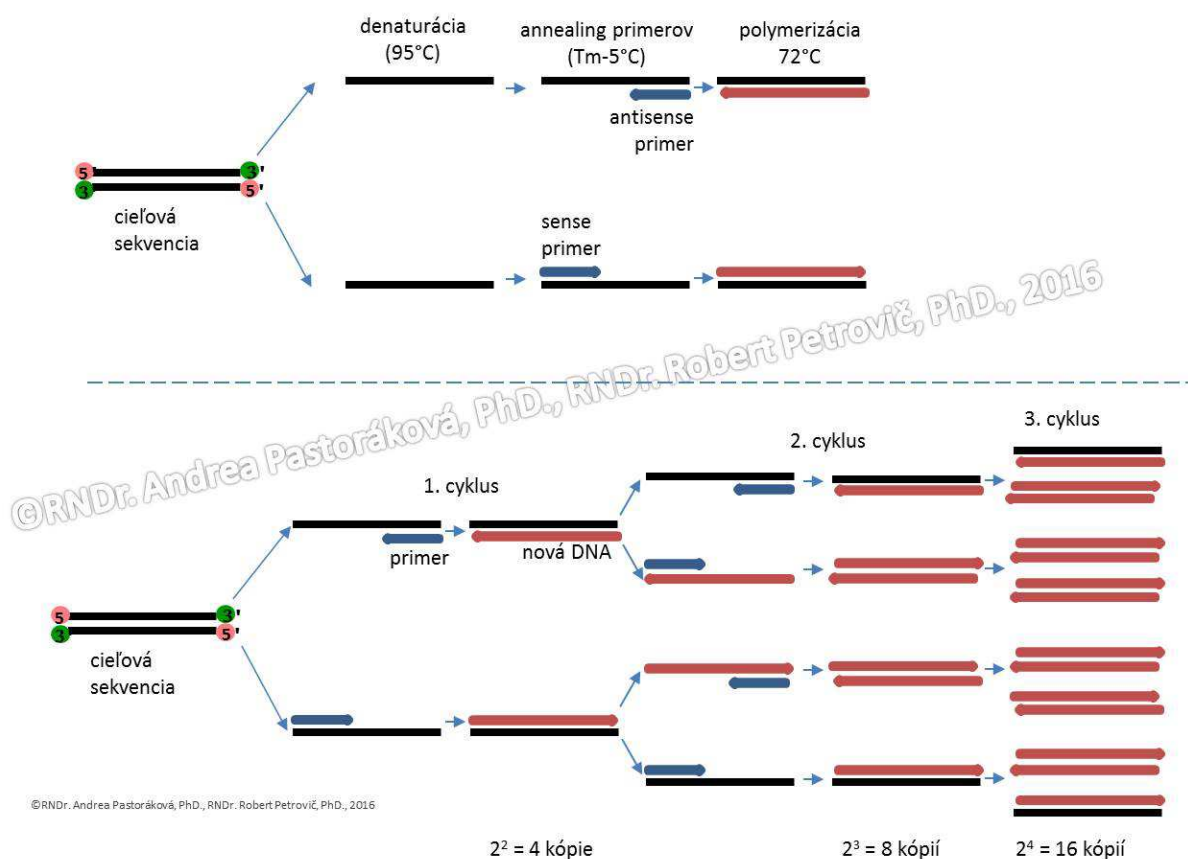
Tabuľka č. 1 uvádza ako sa PCR reakcia z mastermixu pripravuje pre jednu vzorku. Keďže v laboratóriu sa zriedka robí PCR reakcia s jednou vzorkou, treba si pripraviť tzv. **premix** (t.j. PCR reakcie pre väčší počet vzoriek, ale bez templátovej DNA), ktorý sa rozdelí do mikroskúmaviek a až potom sa k nim pridá DNA resp. cDNA.

Tab. 1. Príprava PCR premixu.

Celkový objem jednej PCR reakcie	10 μ l	Počet vzoriek	8
2x PCR master mix	5		40
primer sense (10 μ M)	0,5		4
primer antisense (10 μ M)	0,5		4
H ₂ O	3,5		28
DNA, cDNA	0,5	rozpipetovať premix po 9,5 μ l do mikroskúmaviek až potom pridať do každej mikroskúmavky zvlášť DNA, cDNA	
spolu objem	10		76

PCR amplifikácia je cyklický proces pozostávajúci z troch krokov (obr. 7):

- 1) **denaturácia** dvojvláknovej DNA pri vysokej teplote (95°C);
- 2) **hybridizácia** (annealing) primerov k špecifickej sekvencii DNA pri teplote vhodnej pre konkrétne primery;
- 3) **polymerizácia** (syntéza) nových vlákien DNA (72°C).



Obr. 7. Princíp PCR

Tieto tri kroky sa opakujú 25 – 40 krát, pričom pri každom cykle sa počet molekúl zdvojnásobí (výsledný počet cieľovej sekvencie je 2^{n+1} , ak na začiatku bola jedna dvojvláknová DNA a počet cyklov je n). PCR prebieha v termálnom cykléri (teplotnom cyklovači), je to prístroj (obr. 8), kde je možné vykonať a naprogramovať celý termálny priebeh PCR reakcie. Tabuľka č. 2 je príkladom termálneho programu pre konkrétnu PCR reakciu.

Po PCR reakcii je výsledný produkt možné vizualizovať elektroforeticky resp. použiť na ďalšiu analýzu.

Tab. 2. Príklad klasického teplotného a časového profilu PCR.

PCR	Teplota	Čas	Opakovanie
	95°C	2 minúty	
	95°C	15 sekúnd	} 30x
	66°C	60 sekúnd	
	72°C	60 sekúnd	
	72°C	5 minút	



Obr. 8. Termálny cyklér v procese a otvorený s mikroskúmavkami

3.2 Variácie PCR

Hot-start PCR využíva DNA polymerázu, ktorú je treba aktivovať vysokou teplotou (napr. 95°C 10 minút). Výhodou používania hot-start polymeráz je možnosť pracovať pri laboratórnej teplote, keďže polymeráza je pri bežnej teplote neaktívna, a tým nemôže dôjsť k vzniku nešpecifických produktov.

Touchdown PCR má v počiatočných cykloch vyššiu teplotu annealingu (účelom je zvýšiť špecificitu PCR produktov na začiatku PCR), neskôr sa teplota annealingu zníži, čo má za následok vyšší výťažok PCR produktu

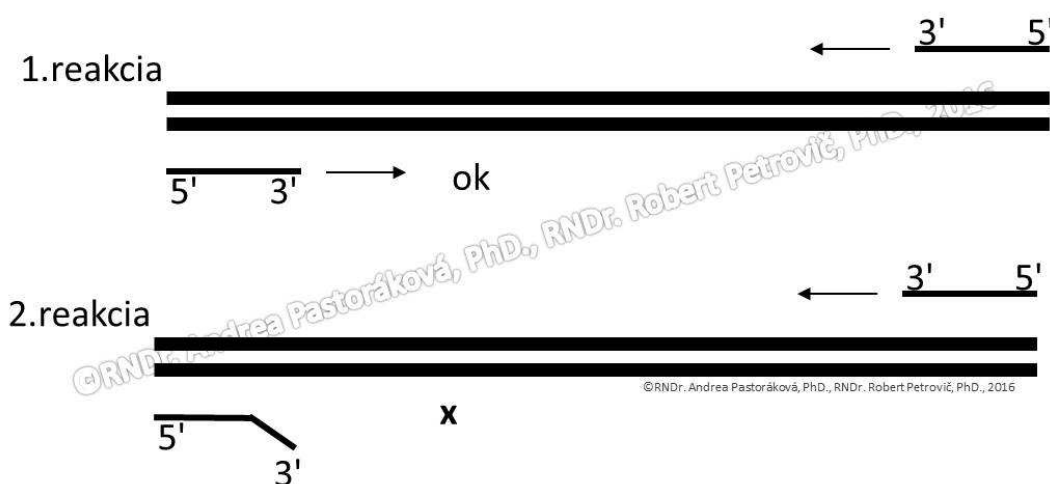
Nested PCR má dva kroky a potrebuje dva páry primerov. V prvom kroku sa prostredníctvom prvej sady primerov amplifikuje dlhší DNA fragment. Ten sa použije ako templát v druhom kroku s druhou sadou primerov s výsledným kratším DNA produktom. Nested PCR zvyšuje špecifickosť a citlivosť diagnostických PCR.

Multiplex PCR je vlastne viac PCR reakcií prebiehajúcich v jednej skúmavke súčasne. V reakčnej zmesi je viac párov primerov, súčasne prebehne amplifikácia viacerých úsekov DNA, takto dochádza k šetreniu vzorky, reakčnej zmesi a pracovného času.

Real-time PCR je venovaná špeciálna časť v skriptách. Slúži na kvantifikáciu PCR produktu v reálnom čase na základe merania fluorescence, okrem kvantifikácie je využívaná aj na určenie genotypov.

RT-PCR je variácia PCR umožňujúca amplifikáciu DNA sekvencie z východiskovej RNA sekvencie. Najskôr musí prebehnúť prepis RNA do jednovláknovej cDNA prostredníctvom reverznej transkriptázy, následne sa cDNA použije pre PCR. Selektívnym použitím primerov pri reverznej transkripcii môžeme účelovo prepísať buď celkovú RNA (primery - random hexaméry) alebo len mRNA (primery - oligoT).

Alelovo-špecifická PCR (AS-PCR) (obr. 9) slúži na detekciu konkrétnych mutácií a jednonukleotidových polymorfizmov (SNP). Použije sa sada 3 primerov v dvoch kombináciách PCR reakcií, dva primery majú odlišnú sekvenciu na 3'-koncoch, jeden na detekciu wt (wild type) a druhý primer na detekciu mutantnej alely, reakcia neprebehne ak miesto na templátovej DNA nie je komplementárne k 3'-koncu primeru, pretože DNA polymeráza vyžaduje úplnú hybridizáciu primera na 3'-konci. Takto je možné rozlíšiť prítomnosť štandardnej (wildtype – wt) a mutantnej alely resp. SNP (obr. 9). AS-PCR je známa aj pod ďalšími názvami **ASO-PCR** (allele-specific oligonucleotide PCR), **ARMS** (amplification-refractory mutation system).



Obr. 9. Alelovo-špecifická PCR (AS-PCR)

Mutagenéza prostredníctvom PCR (site directed mutagenesis) sa používa, keď je potrebné vytvoriť mutáciu v špecifickom mieste génu, primer/primery majú modifikovanú sekvenciu tak, že obsahujú mutáciu v strednej časti, čo neovplyvní hybridizáciu primerov s templátovou DNA, pričom výsledkom je PCR produkt s cielene mutovanou DNA sekvenciou.

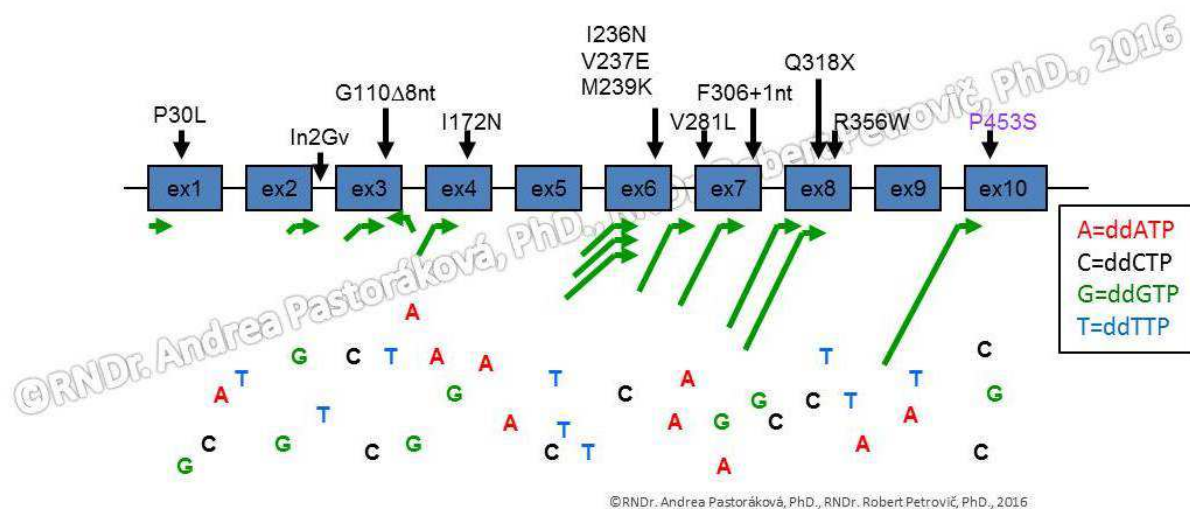
Asymetrická PCR sa používa na syntézu kópií jedného vlákna z templátovej DNA a to použitím veľmi nízkej koncentrácie jedného primeru.

Sekvenačná PCR je PCR, v ktorej je použitý len jeden primer a v reakčnej zmesi sú okrem všetkých dNTP prítomné dideoxynukleotidtrifosfáty (ddNTP) značené rádioaktívne, dnes však prevažne fluorescenčne, každý typ ddNTP inou fluorescenčnou farbičkou. Zaradenie niektorého zo štyroch ddNTP spôsobí termináciu (zastavenie) predlžovania DNA reťazca, fluorescenčné označenie ddNTP umožní detekciu dĺžky fragmentu a určenie sekvencie posledného nukleotidu. Výsledný produkt sekvenačnej PCR slúži na sekvenovanie. Sekvenovaniu sa venuje samostatná časť.

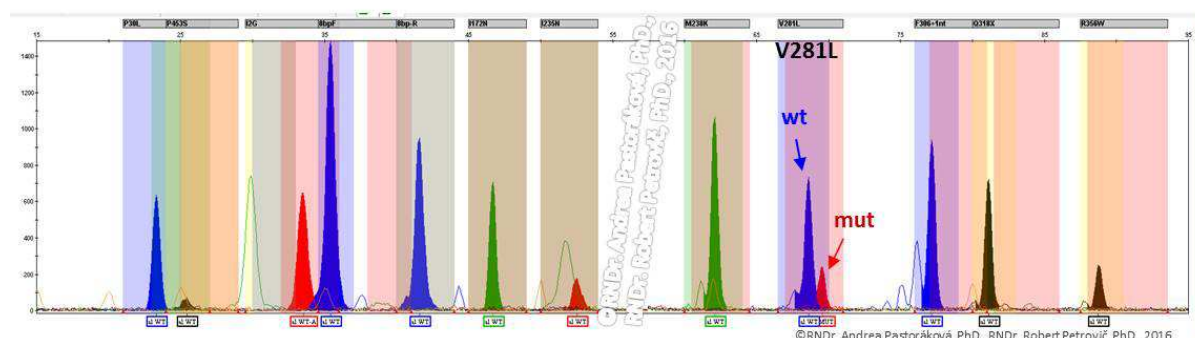
MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) – multiplexná amplifikácia prôb závislá od ligácie, je variácia multiplexnej PCR umožňujúca namnoženie viacerých úsekov DNA za použitia iba jedného páru primerov, avšak s podmienkou vytvorenia sekvenčne špecifickej próby ligáciou sekvenčne špecifických oligonukleotidov. MLPA je metóda umožňujúca detekciu počtu kópií

až 50 nukleotidových sekvencií v jednej reakcii. Pomocou MLPA je možné rýchlo identifikovať amplifikácie a delécie veľkého počtu génov, či už z DNA alebo mRNA, okrem toho MLPA môže byť použitá na analýzu CpG-metylácie (MS-MLPA). Viac informácií v samostatnej časti.

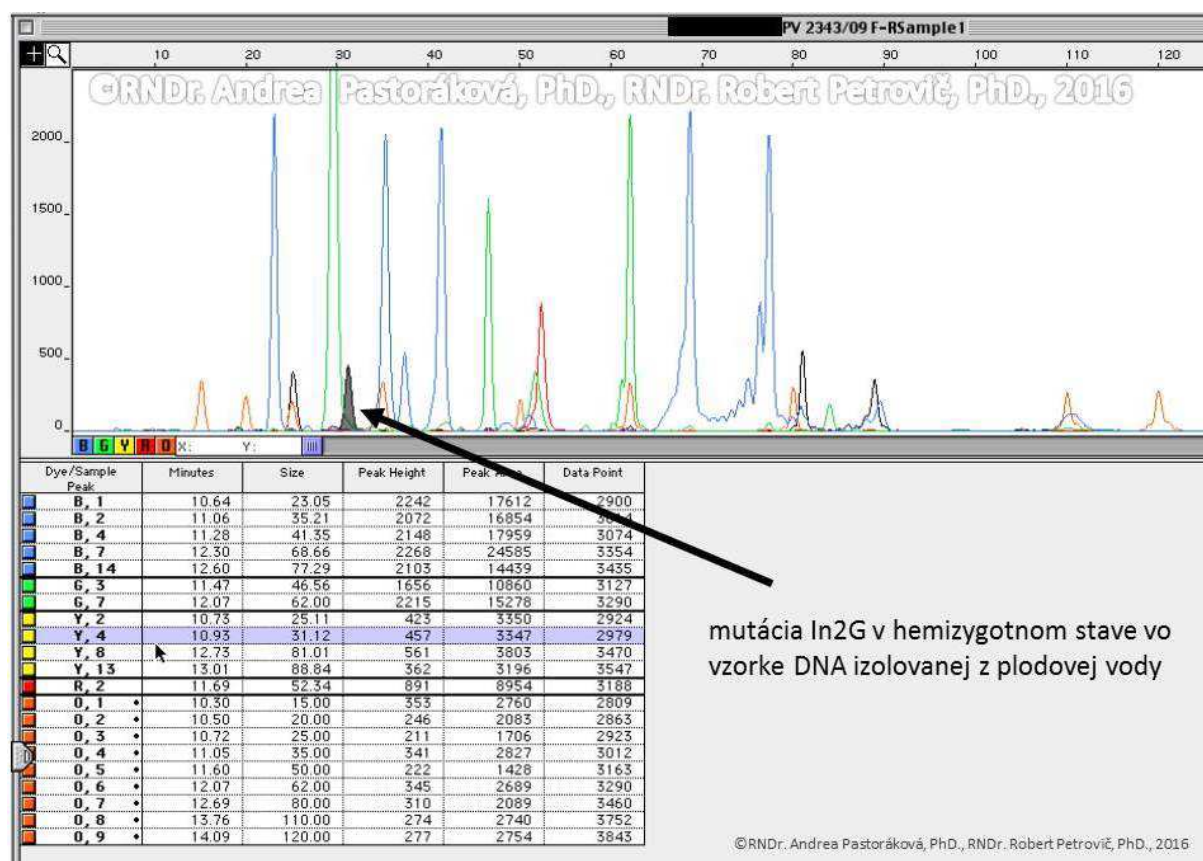
SNaPshot® Multiplex, nazývané aj **minisekvenovanie**, je multiplexná reakcia, v ktorej je každý primer predĺžený iba o jeden nukleotid (obr. 10). V reakčnej zmesi nie sú prítomné deoxyribonukleotidtrifosfáty ale len dideoxyribonukleotidtrifosfáty (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP), každý označený inou fluorescenčnou farbičkou. Po integrácii ddNTP do DNA vlákna je polymerizácia ukončená. Jednovláknové fragmenty (primery) predĺžené presne o jeden ddNTP sú separované kapilárnou elektroforézou v genetickom analyzátoe, pričom je detegovaná ich fluorescencia a dĺžka (obr. 11). Z výsledného elektroforetogramu (obr. 12) je možné určiť v jednej reakcii sekvenciu vo viac ako v 10 lokalitách určitého fragmentu DNA. SNaPshot Multiplex sa v molekulárno-genetickom laboratóriu využíva na rýchlu detekciu viacerých najčastejšie sa vyskytujúcich mutácií/SNP génu.



Obr. 10. Príklad využitia metódy SnaPshot s použitím sady 13 primerov, ktoré sa predlžia len o 1 značený dideoxynukleotid. SNaPshot najčastejších mutácií génu pre 21-hydroxylázu (*CYP21A2*), ktoré spôsobujú kongenitálnu adrenálnu hyperpláziu. A, T, G a C predstavujú fluorescenčne značené dideoxynukleotidy.



Obr. 11. Výsledok analýzy DNA pacienta metódou minisekvenovania SnaPshot, konkrétne použitím sady 13 primerov rozlišujúcich najčastejšie bodové mutácie génu pre 21-hydroxylázu (*CYP21A2*), analýzou sa zistila mutácia V281L v heterozygotnom stave (dva fragmenty modrý a červený).



Obr. 12. SNaPshot analýza génu *CYP21A2* u DNA izolovanej z plodovej vody, metóda deteguje najčastejšie bodové mutácie génu pre 21-hydroxylázu, výsledok prenatalnej analýzy = prítomnosť mutácie In2G v hemizygotnom stave (keďže qPCR metódou bola u plodu zistená prítomnosť len jednej kópie génu *CYP21A2*).

3.3 Kvantitatívna PCR (qPCR)

Polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) docielime namnoženie (amplifikáciu) určitého DNA úseku (templátu). PCR je katalyzovaná DNA polymerázou za prítomnosti primerov, dNTPs, dvojmočných kationov (ako Mg^{+2}) a pufrovacieho roztoku.

Real-time PCR, ktorá je nazývaná aj **kvantitatívna PCR (qPCR)** umožňuje vizualizáciu a kvantifikáciu amplifikácie DNA v reálnom čase, to je tak, ako to beží počas PCR. qPCR využíva fluorescenčné chemikálie (farbivá), ktorých emitovanú fluorescenciu zaznamenáva optický systém počas každého PCR cyklu, zaznamenaná fluorescencia je následne softvérovo spracovaná a vyhodnotená.

V súčasnosti sa využívajú dva typy qPCR chémie a to farbivá viažuce sa na DNA a fluorescenčne značené próby (obr. 13).

Farbivá viažuce sa na DNA emitujú fluorescenciu v prípade, ak sú naviazané na dvojvláknovú DNA; próby fluoreskujú, v prípade, keď molekula **zhášača** (angl. quencher - **Q**) sa nenachádza v blízkosti molekuly **reportéra** (**R**), napr. hydrolyzujúce próby fluoreskujú, keď je molekula reportéra (**R**) prostredníctvom 5' exonukleázovej aktivity DNA polymerázy odstránená z blízkosti molekuly zhášača (**Q**).

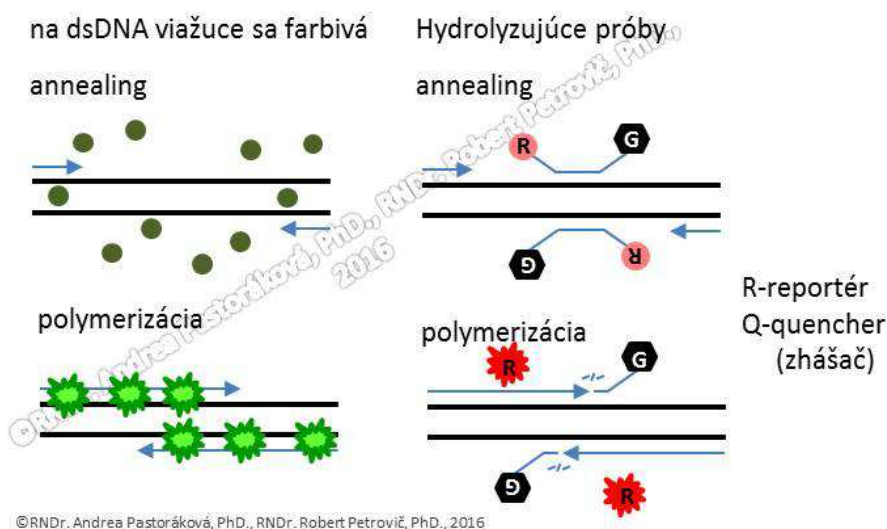
Grafický priebeh real – time PCR znázorňuje **amplifikačná krivka** (angl. amplification plot) (obr. 14) majúca 4 fázy:

1) Fáza I – dochádza k zdvojnásobeniu množstva amplikónu po každom cykle, ale nárast fluorescencie je pod detekčným limitom; zaznamenávaná fluorescencia (baseline) zodpovedá základnej fluorescencii pozadia tzv. šumu;

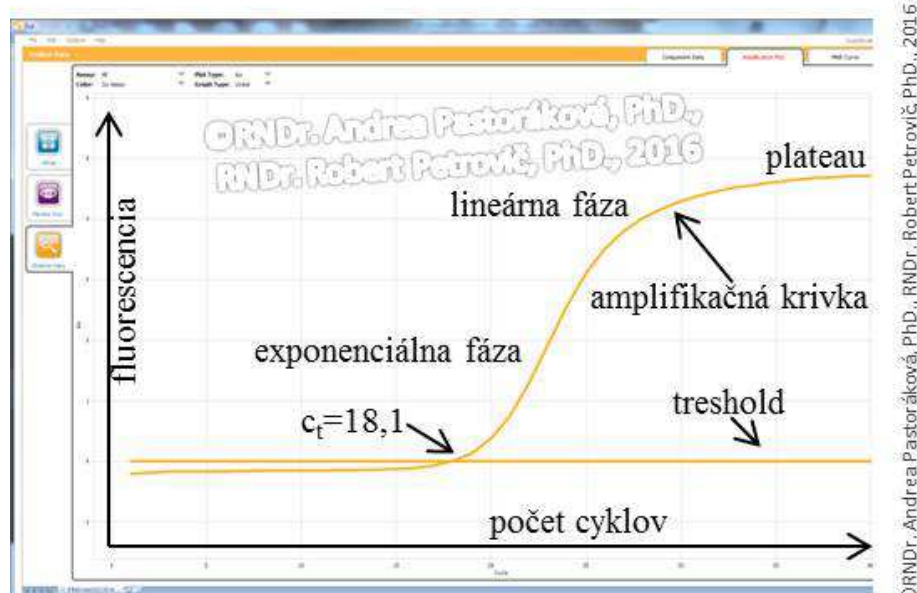
2) **Fáza II** nazývaná aj **exponenciálna fáza**, v ktorej sa fluorescencia zvýši na úroveň optickej detekcie, bod, resp. cyklus, kedy začína exponenciálna fáza je kľúčový na určenie kvantity vstupného množstva templátovej DNA, nazýva sa **prahový cyklus**, označuje sa **Ct** (angl. threshold cycle) alebo **Cq** (quantification). Čím nižšie je Ct (Cq), tým väčší počet kópií templátovej DNA bolo v reakcii. Ct hodnota je teda hlavný údaj, s ktorým sa pracuje vo výpočtoch, fluorescencia v tomto mieste sa nazýva **prahová**, resp. **threshold**;

3) **Fáza III - lineárna fáza** – charakterizuje ju postupné spotrebovávanie komponentov reakcie na narastajúce množstvo amplikónu;

4) **Fáza IV - plateau** (čítaj plató) – množstvo amplikónu sa v dôsledku vyčerpania zložiek qPCR už nezvyšuje.



Obr. 13. Princíp real-time PCR.



Obr. 14. Fázy real-time PCR.

Ako štandardná PCR aj qPCR má **tri základné kroky**:

- 1) **Denaturácia** dvojvláknovej DNA na jednovláknovú DNA pri vysokej teplote (obvyčajne 95°C);
- 2) **Hybridizácia** primerov (annealing) – komplementárne sekvencie sa spolu hybridizujú;
- 3) **Polymerizácia** pri 70-72°C, kedy v dôsledku optimálnej aktivity DNA polymerázy dochádza k predĺženiu primeru až o 100 báz za sekundu.

Real-time PCR (obr. 15) sa využíva na kvantifikáciu expresie génov, určenie počtu kópií génov, určenie genotypu (genotypovanie) alelovou diskrimináciou alebo analýzou krivky topenia tzv. high resolution melt a multiplexnú real time PCR s možnosťou detekcie viacerých cieľov/génov.

Multiplexná real-time PCR sa využíva na detekciu viacerých cieľov/génov v jednej reakcii súčasne. Výhodou multiplexovania je jednak úspora vzorky, ako aj získanie väčšieho množstva informácií z rovnakého množstva materiálu. Nevyhnutnosťou multiplexnej qPCR sú próby značené rôznymi fluorescenčnými farbivami.

Najdôležitejšie zložky qPCR (**real-time PCR komponenty**) sú DNA polymeráza, (reverzná transkriptáza v prípade jednokrokovej kvantitatívnej RT-PCT), dNTPs, primery, resp. primery/próby, dvojmocné Mg, templát. Na uľahčenie qPCR sú v súčasnosti už komerčne dostupné také reakčné zmesi, ku ktorým stačí pridať už len templát (napr. kity využívajúce TaqManPróby) alebo kity s fluorescenčnými farbami viažucimi sa na dvojvláknovú DNA, ku ktorým sa do reakčnej zmesi okrem templátu pridajú primery.



Obr. 15. Real-time PCR cyklér

3.3.1 Kvantifikácia pomocou qPCR

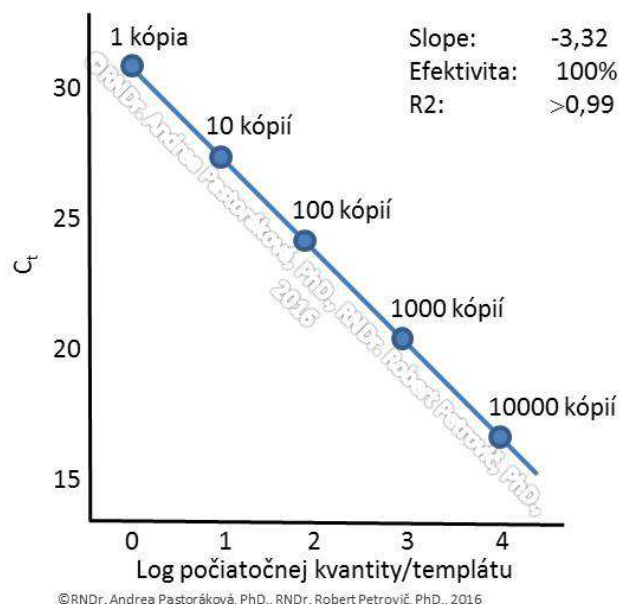
Na kvantifikáciu DNA pomocou qPCR sa používajú dve základné metódy - **absolútna kvantifikácia** a **relatívna kvantifikácia**.

Absolútna kvantifikácia vychádza zo štandardnej krivky (obr. 16), ktorá sa získa po qPCR série riedení DNA známej koncentrácie. Kvantifikácia neznámej vzorky sa zistí interpoláciou (odčítaním) Ct neznámej vzorky zo štandardnej krivky (obr. 16, 17). Využívané napr. v kriminalistike na stanovenie koncentrácie DNA vo vzorke.

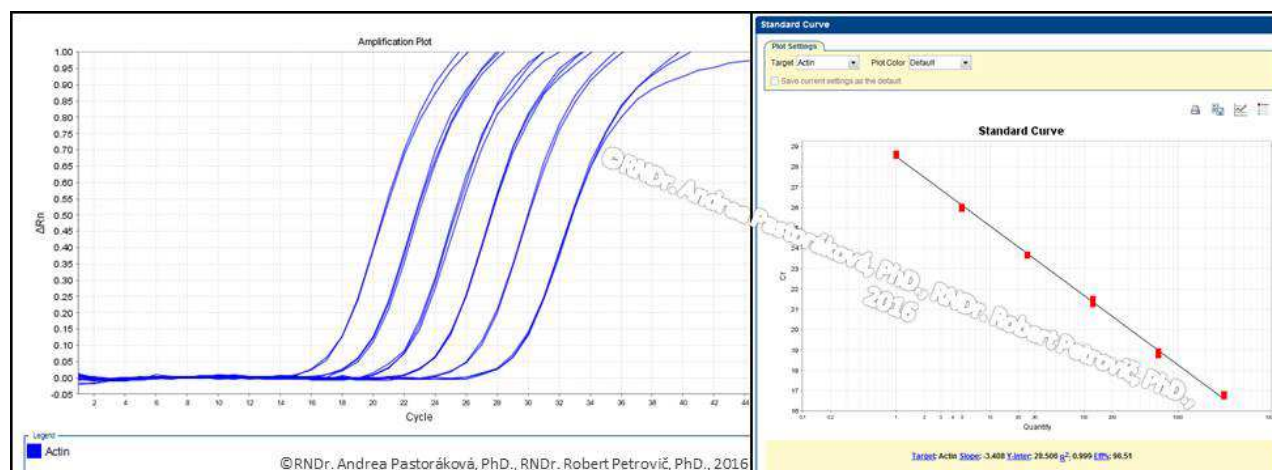
Relatívna kvantifikácia (obr. 18, 19) porovnáva úroveň expresie určitého génu vo vzorke k expresii toho istého génu v **referenčnej (kontrolnej) vzorke** alebo množstvo určitého génu (počet kópií) vo vzorke porovnaním s množstvom génu v kontrolných vzorkách. V rámci každej vzorky musí pred relatívnou kvantifikáciou dôjsť k tzv. **normalizácii**, t. j. porovnanie expresie sledovaného génu k expresii referenčného génu (najčastejšie ním býva tzv. „housekeeping“ gén napr. *GAPDH*, aktín, tubulín).

V prípade kvantifikácie expresie určitého génu metódou real-time PCR (RT-qPCR), pred samotnou kvantifikáciou cDNA, musí byť táto cDNA nasyntetizovaná prostredníctvom reverznej

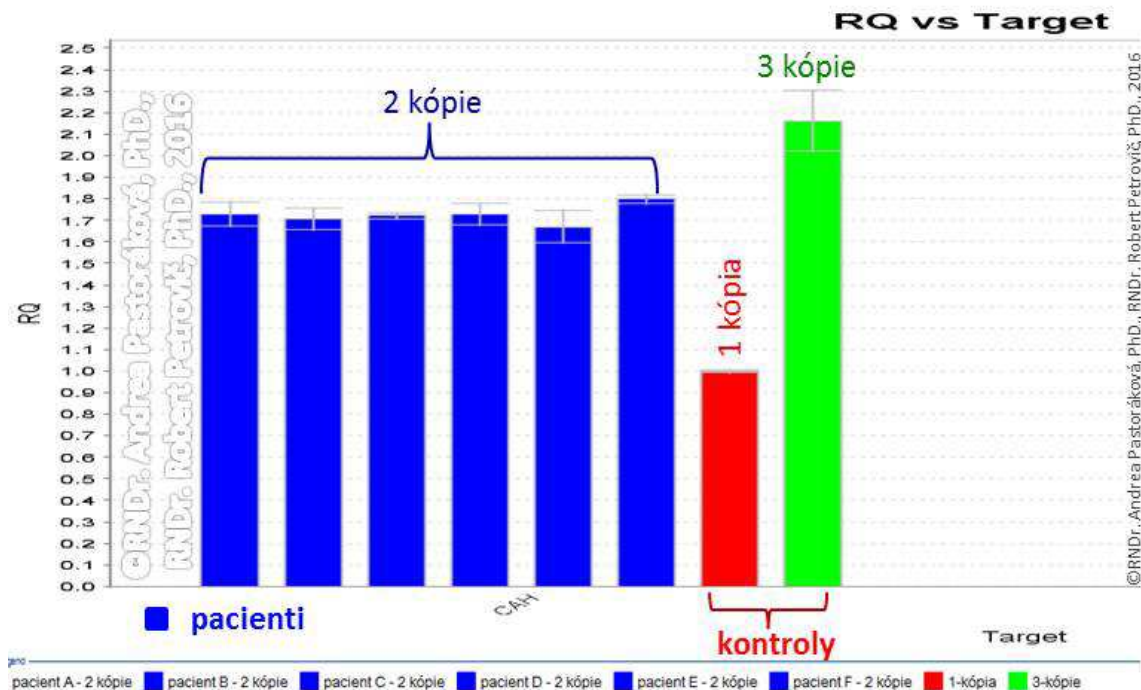
transkripcie za použitia enzýmu reverznej transkriptázy. **Kvantitatívna PCR s reverznou transkripciou, RT-qPCR**, môže byť dvojkroková alebo jednokroková. Pri dvojkrokovej RT-qPCR treba pred qPCR syntetizovať cDNA vlákno z RNA pomocou reverznej transkriptázy - 1. krok; druhým krokom je samotná real-time PCR. Jednokroková RT-qPCR umožňuje uskutočniť obidve reakcie: reverznú transkripciu a kvantitatívnu PCR v jednej skúmavke, čo zjednodušuje qPCR a redukuje možnosť kontaminácie.



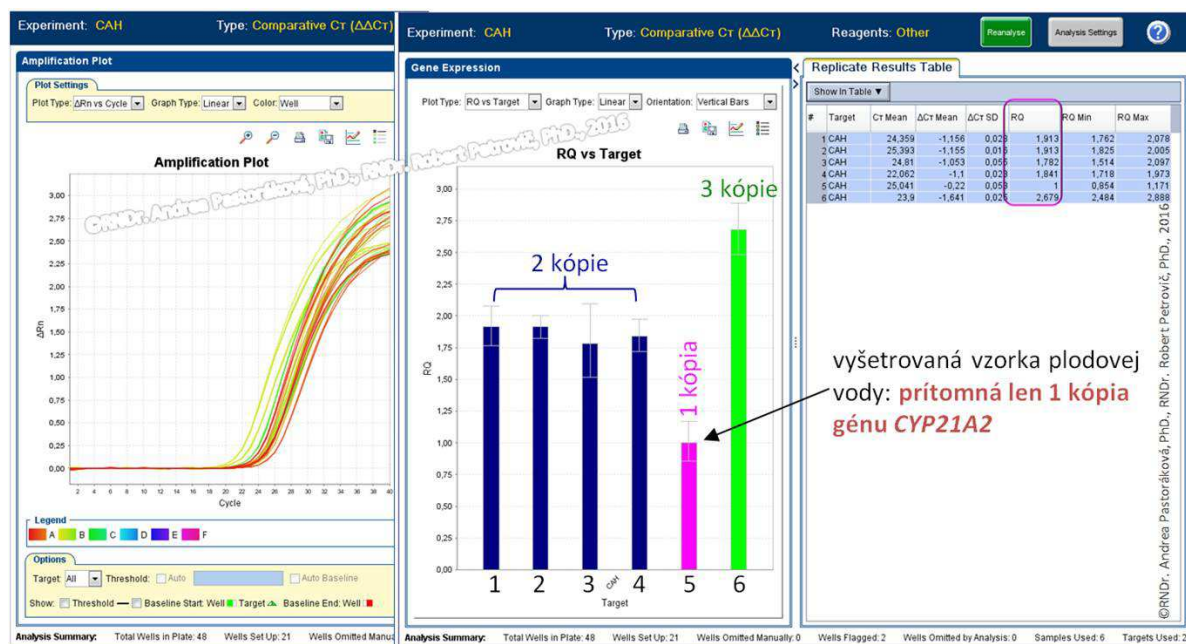
Obr. 16. 5-bodová štandardná krivka (amplifikácia piatich koncentrácií jednej vzorky konkrétne ide o 10-ťkové riedenie).



Obr. 17. Ukážka amplifikačných kriviek riedenia a z nich získanej štandardnej krivky poukazuje na vysokú presnosť metódy RT-PCR.



Obr. 18. Relatívna kvantifikácia - určenie počtu kópií génu *CYP21A2* vo vzorke DNA izolovanej z periférnej krvi pacientov, mutácie v géne *CYP21A2* spôsobujú kongenitálnu adrenálnu hyperpláziu (CAH). Výsledok analýzy: všetci pacienti majú dve kópie génu.

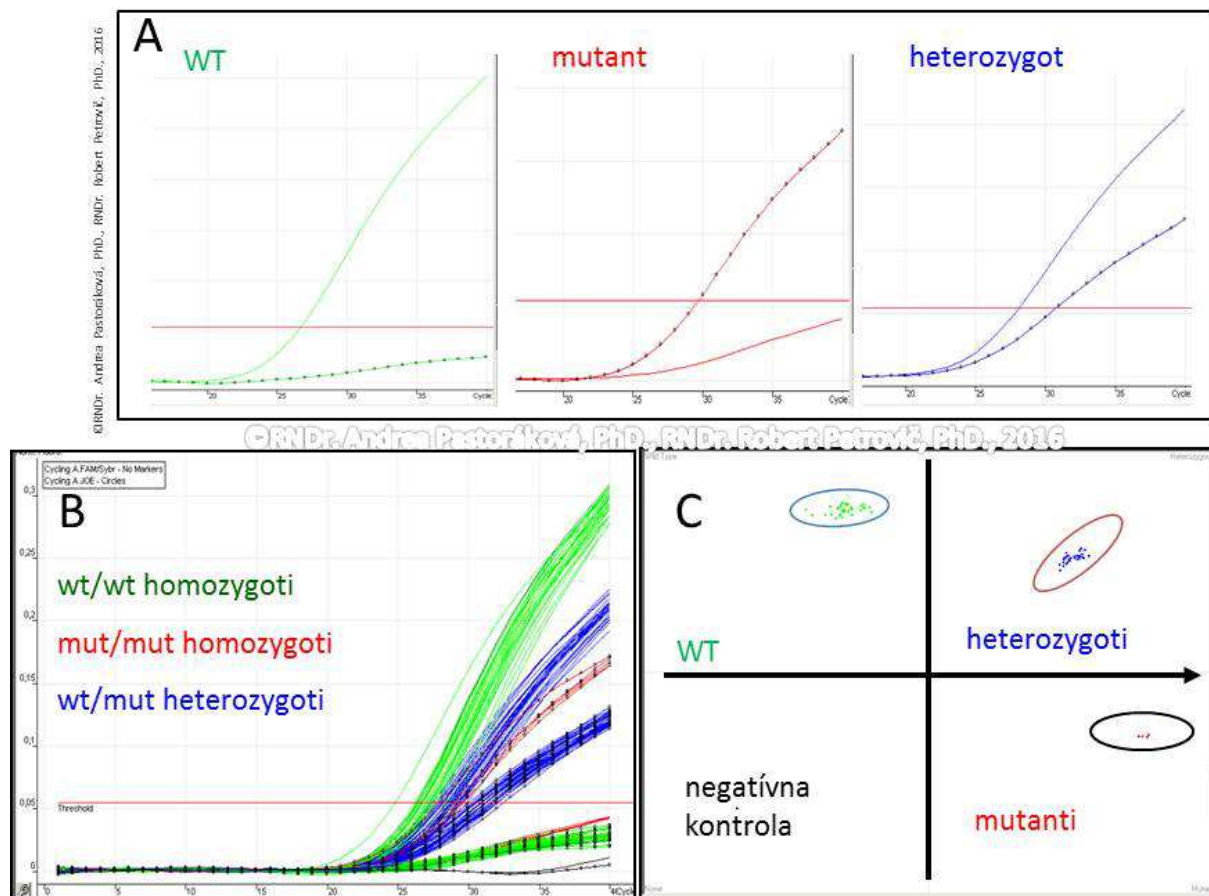


Obr. 19. Relatívna kvantifikácia - určenie počtu kópií génu *CYP21A2* vo vzorke DNA izolovanej z plodovej vody, mutácie v géne *CYP21A2* spôsobujú kongenitálnu adrenálnu hyperpláziu (CAH). Prenatálnou diagnostikou (qPCR) sa zistila prítomnosť jednej kópie *CYP21A2* génu.

3.3.2 Určenie genotypu metódou alelovej diskriminácie a analýzou krivky topenia (HRM)

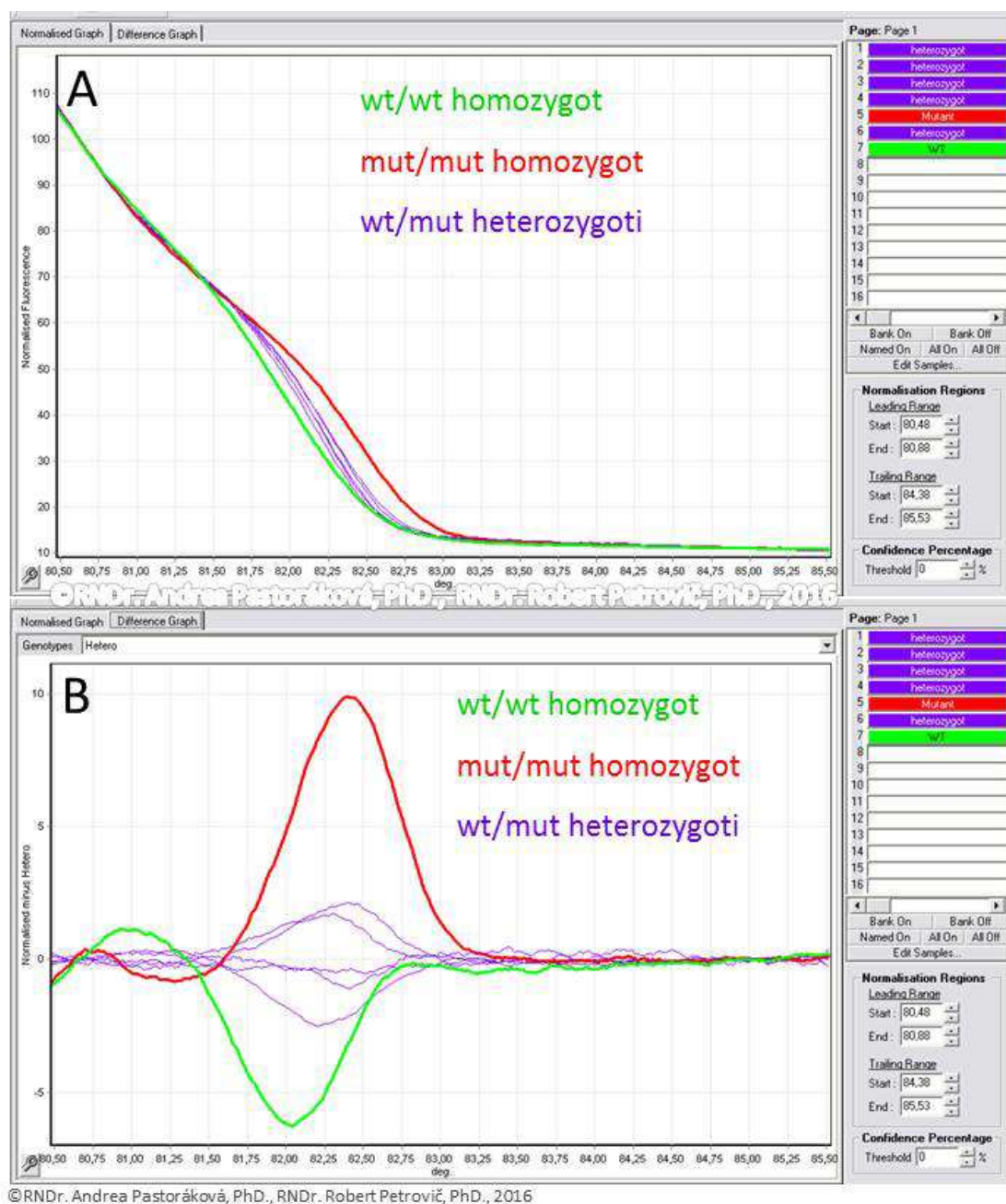
Určenie genotypu **metódou alelovej diskriminácie** (obr. 20) sa uskutočňuje **použitím hydrolyzujúcich prôb (sond)**, je veľmi rýchla a senzitívna (presná) metóda frekventovane využívaná v laboratóriách. Dva varianty/alely sú vyšetrené súčasne v jednej vzorke a v jednej reakčnej

skúmanke. V reakcii sú použité dve próby označené rozdielnymi fluorescenčnými farbami emitujúcimi svetlo o rôznej vlnovej dĺžke (najčastejšie jedna označená FAM farbičkou a druhá próba označená VIC farbičkou). Počas amplifikácie amplikónu dochádza k odstráneniu zhášača z blízkosti farbičky, ktorá potom emituje svetlo príslušnej vlnovej dĺžky. Vzorky so signálom len jednej fluorescenčnej farbičky (FAM) a bez signálu druhej farbičky (VIC) sú homozygoti pre alelu 1, vzorky so signálom len druhej farbičky (VIC) a bez signálu prvej (FAM) sú homozygoti pre alelu 2, v prípade ak vyšetrovaná vzorka „svieti“ obidvoma farbami jedná sa o heterozygota.



Obr. 20. Určenie genotypu metódou alelovej diskriminácie – amplifikačná krivka vzoriek DNA majúcich tri rôzne genotypy: A – jednotlivé vzorky (plná čiara predstavuje štandardnú alelu, guľčikovaná mutovanú alelu), B – 72 vzoriek, C – scatter plot 72 vzoriek.

Určenie genotypu **analýzou krivky topenia tzv. high resolution melt (HRM)** (obr. 21) umožňuje detekciu takmer všetkých genetických variácií (SNP, mutácií). Keďže táto metóda okrem štandardných podmienok reakcie vyžaduje len primery a farbičku (nie próby), je veľmi jednoduchá a lacnejšia. Po amplifikácii treba amplikón pomaly zohrievať, až kým nedôjde k denaturácii. Teplota topenia amplikónu vo vzorke závisí od DNA sekvencie, čo umožňuje detegovať prítomnosť mutácie resp. SNP. Tvar výsledných kriviek topenia určuje teda genotyp.

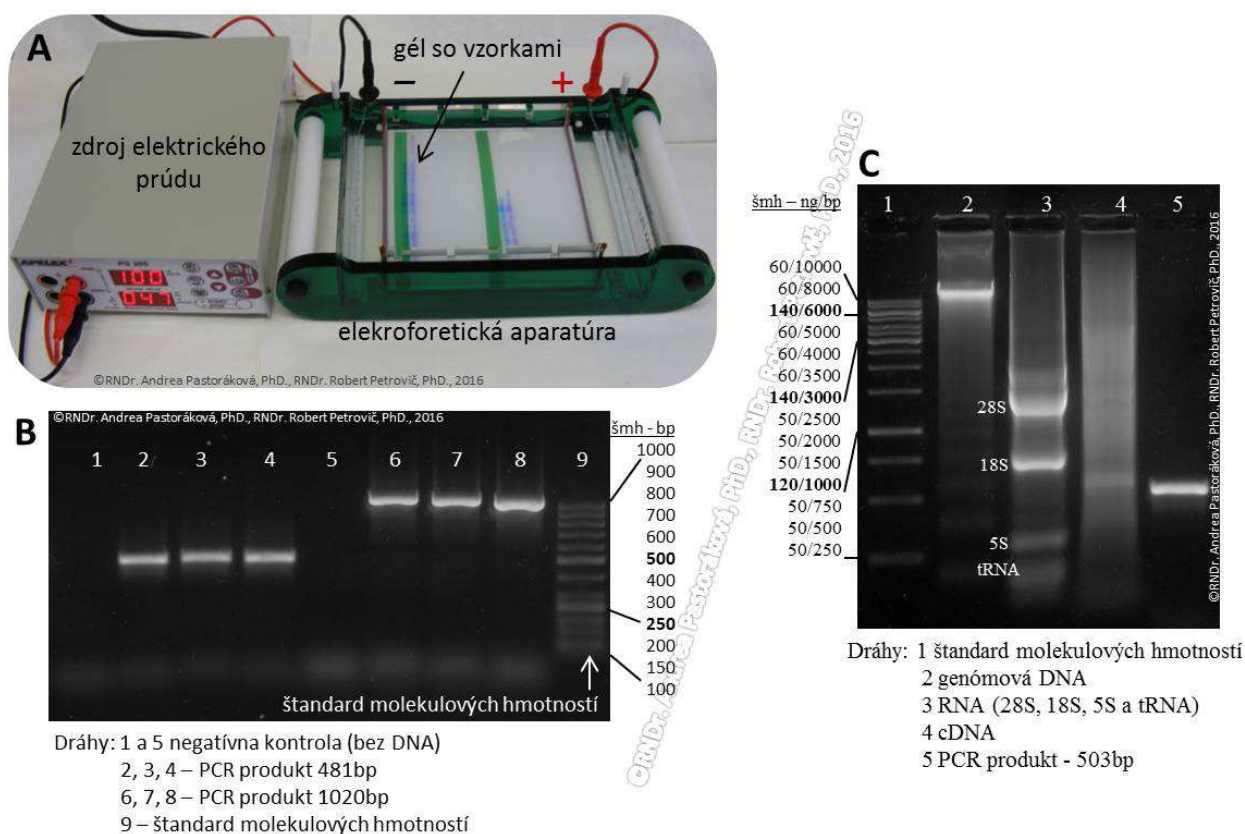


Obr. 21. Určenie genotypu analýzou krivky topenia tzv. metódou high resolution melting (HRM), A – krivka topenia vzoriek DNA majúcich tri rôzne genotypy, B – graf rozdielnosti krivky topenia vzoriek DNA majúcich tri rôzne genotypy.

4. Elektroforetická separácia nukleových kyselín

Separácia nukleových kyselín predstavuje rozdelenie molekúl DNA alebo RNA na základe veľkosti, zloženia a poradia báz. Podobnými metódami je možné separovať aj proteíny.

Elektroforéza (ELFO) je technika používaná na separáciu niekedy aj purifikáciu makromolekúl, ako sú nukleové kyseliny a proteíny na základe ich rozdielnej veľkosti, náboja alebo konformácie. Je to metóda veľmi často využívaná nielen v molekulovej genetike ale aj biochémii. Elektroforéza využíva schopnosť nabitých molekúl migrovať v jednosmernom elektrickom poli k opačnému pólu. Nukleové kyseliny majú vďaka svojej fosfátovej zložke negatívny náboj, preto v jednosmernom elektrickom poli migrujú ku kladnému pólu, čiže k anóde. Elektroforéza prebieha v elektroforetickej aparátúre v **géloch (v nosiči)** so sieťovitou štruktúrou, ktorá umožňuje separáciu molekúl. Vzorka nukleovej kyseliny zmiešaná s tzv. nanášacím tlmivým roztokom s farbičkou sa nanesie do jamky v géli, ktorý je umiestnený v elektroforetickej aparátúre v prítomnosti elektroforetického pufra (TAE alebo TBE) (obr. 22). **Nanášací tlmivý roztok/nanášacia farbička** umožňuje na základe migrácie farbičky vidieť migráciu vzorky v géli; a súčasne zvýšením hustoty vo vzorke umožní klesnúť vzorke do jamky a tak zabrániť jej vyplaveniu z gélu. Dráha je časť gélu, ktorým putuje jedna vzorka od katódy k anóde. V dráhe sa nachádzajú oddelené jednotlivé fragmenty nukleových kyselín určitých veľkostí viditeľné vo forme prúžkov (angl. bands). Intenzita prúžku závisí od množstva molekúl danej veľkosti, je ekvivalentná hmotnosti. Na určenie veľkosti fragmentov NK sa do jednej jamky nanesie **štandard molekulových hmotností** (angl. ladder), ktorý má presne definované veľkosti fragmentov, čo umožňuje odhadnúť veľkosť aj hmotnosť neznámych separovaných fragmentov.



Obr. 22. Elektroforetická separácia nukleových kyselín v agarózovom géli (A) a vizualizácia UV svetlom a GelRed™ (B, C).

Nukleové kyseliny je možné elektroforeticky separovať:

- 1) **v géloch: agarózovom** (horizontálna elektroforéza) (obr. 22) a **polyakrylamidovom** (vertikálna elektroforéza);
- 2) **v špeciálnych lineárnych polyméroch kapilárnou elektroforézou** použitím genetického analyzátoru (obr. 23).

Agaróza je polysacharid získaný z morskej riasy, používa sa najčastejšie v koncentrácií 0,5-2%, čím vyššia koncentrácia, tým je gél pevnejší a schopnejší rozlíšiť menšie fragmenty NK. Príprava je jednoduchá: odváži sa potrebné množstvo agarózy, ktorá sa zmieša s tlmivým roztokom (pufrom), rozvarí sa v mikrovlnnej rúre a naleje sa do špeciálnej nádoby na vytváranie gélov, kým je gél tekutý, vloží sa do neho tzv. hrebeň na vytvorenie jamiek. Agaróza je netoxická. V bežnom agarózovom géli v závislosti od jeho koncentrácie je možné separovať DNA fragmenty dĺžky 200-50 000 bp. Dnes sú dostupné aj špeciálne agarózy napr. MetaPhor® Agarose, schopné oddeliť fragment DNA dĺžky 20-800bp. Separácia v agarózovom géli prebieha v horizontálnej aparátúre, preto sa nazýva aj **horizontálna elektroforéza**.

Polyakrylamidový gél (PAGE) vzniká polymerizáciou akrylamidu v prítomnosti špeciálnych chemických látok (peroxodisíran amónny, TEMED, bisakrylamid). Jeho príprava je preto odlišná a aj náročnejšia. Polyakrylamidové gély majú vysokú rozlišovaciu schopnosť (1bp), preto sú PAGE gély vhodné aj na sekvenovanie DNA klasickými metódami. PAGE gél nie je vhodný na separáciu fragmentov dlhších ako 2kb. Používa sa v koncentracii 3,5 -20% s rozlíšením fragmentov od 10bp-2000bp. Akrylamid je neurotoxín, musí sa s ním pracovať veľmi opatrne. PAGE elektroforéza beží vo vertikálnej aparátúre, preto sa volá aj **vertikálna elektroforéza**, používa sa často aj na separáciu proteínov.

Rýchlosť pohybu nukleových kyselín (mobilita) určuje viacero faktorov:

- 1) **veľkosť NK** – počet básových párov resp. báz, pričom menšie molekuly prechádzajú gélom rýchlejšie, pretože sa ľahšie pohybujú v géli;
- 2) **konformácia nukleovej kyseliny** napr. u rovnako veľkých plazmidov kondenzované superspiralizované plazmidy migrujú najrýchlejšie, rovnako veľké lineárne molekuly (toho istého plazmidu) bežia pomalšie a najpomalšie putujú relaxované kruhové molekuly plazmidu;
- 3) **koncentrácia gélu** určuje jeho rozlišovaciu schopnosť, koncentrovanejší gél je schopný separovať kratšie fragmenty NK, redšie gély sú vhodné pre rozlíšenie väčších fragmentov;
- 4) **zloženie gélu** je dôležité pri analýze sekundárnych štruktúr NK a proteínov v nedenaturovanom stave; sekundárna štruktúra spomaľuje migráciu NK a proteínov. Tento fakt využívajú niektoré diagnostické techniky (napr. **SSCP** - **Single Strand Conformation Polymorphism** - polymorfizmus konformácie jednovláknovej DNA) umožňujúce detekciu zámieny jedinej bázy, ktorá spôsobí odlišné vnútromolekulové párovanie a výslednú konformáciu molekuly. Gély môžu teda byť **denaturačné** a **nedenaturačné (natívne)**;
- 5) **napätie zdroja** - čím vyššie je napätie, ktoré vytvára elektrické pole v elektroforetickej aparátúre, tým rýchlejšie fragmenty NK migrujú;
- 6) **zloženie roztokov a teploty**.

Elektroforetický tlmivý roztok (pufor - elektrolyt) zabezpečuje stabilné elektroforetické podmienky počas separácie, gél je v ňom ponorený. Obsahuje ióny, čo umožňuje vedenie elektrického prúdu.

Štandard molekulových hmotností (v laboratóriách nazývaný ladder alebo marker) je zmes fragmentov DNA alebo RNA s presne definovanou veľkosťou, ktorý slúži na odhad veľkosti vyšetřovaných fragmentov NK (obr. 22). Pomocou špeciálnych štandardov molekulových hmotností, ktorých fragmenty NK majú definovanú aj hmotnosť, je možné odhadnúť množstvo (hmotnosť - koncentráciu) neznámeho fragmentu.

4.1 Vizualizácia DNA

Samotná nukleová kyselina je počas elektroforetickej separácie neviditeľná. Vizualizáciu NK umožňujú interkalačné činidlá, ktoré sú schopné naviazať sa na molekuly NK tým, že sa včlenia medzi susediace bázy. Po ožiarení UV svetlom interkalačné činidlá naviazané na NK fluoreskujú, tak sa vizualizuje NK, čím intenzívnejšie fluoreskuje, tým viac NK je v géli/prúžku prítomné. Interkalačné činidlo sa buď primieša do gélu pri jeho príprave, čo umožní sledovať migráciu fragmentov NK počas elektroforézy a to po vybratí z ELFO aparatury a po ožiarení UV svetlom, alebo sa gél farbí po elektroforetickej separácii. V minulosti bol na zviditeľnenie NK najčastejšie používaný etidiumbromid, kvôli jeho mutagénnym vlastnostiam sa v súčasnosti nahrádza menej mutagénnymi a netoxickými činidlami, ako sú napr. komerčne dostupné SYBR®Safe, GelRed™, GelGreen™.

Kapilárna elektroforéza NK prebieha v špeciálnom prístroji, genetickom analyzátore (obr. 23), ktorý musí mať základné komponenty, ako sú elektródy, kapilára, zdroj vysokého napätia, detektor, prepojenie s počítačom a softvérové vybavenie, priestor na vloženie vzoriek atď. Genetický analyzátor predstavuje automatizovaný systém umožňujúci **sekvenovanie**, určovanie dĺžky DNA fragmentov – **fragmentačnú analýzu** a **kvantifikáciu nukleových kyselín**. V novších typoch genetického analyzátora je proces analýzy od vloženia vzoriek do stojana automatizovaný.

Vzorka určená na analýzu je elektrokineticky injektovaná do tenkej kapiláry naplnenej lineárnym polymérom. Vplyvom vysokého napätia sa negatívne nabité fragmenty DNA pohybujú v polyméri k pozitívne nabitej elektróde. Kapilárna elektroforéza je tak citlivá, že je schopná detegovať jednobázový rozdiel DNA fragmentov. DNA fragmenty musia byť pred kapilárnou elektroforézou fluorescenčne označené, v kapiláre sú separované na základe veľkosti. Krátko pred dosiahnutím kladne nabitej elektródy dôjde po excitácii laserovým žiarením k emisii žiarenia fluoroformi (farbičkami) tak, že optický detekčný systém zaznamená fluorescenciu, ktorá je následne softvérovo spracovaná a vyhodnotená.



Obr. 23. Genetický analyzátor

4.2 RFLP

Metóda polymorfizmu dĺžky restriktčných fragmentov (angl. **R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) bola prvou metódou využívanou na detekciu DNA variácií rôznych biologických vzoriek. Princíp metódy spočíva v prítomnosti polymorfizmov v DNA sekvencii rôznych ľudí, ktoré zapríčinia rozdielny profil (obrazec) DNA fragmentov po štiepení jednou alebo viacerými restriktčnými endonukleázami. **Restriktčné endonukleázy (RE)** sú enzýmy, ktoré štiepia DNA molekulu v oblasti špecifickej nukleotidovej sekvencie nazývanej **restriktčné miesto**. RE najčastejšie rozpoznávajú a štiepia miesto veľké 4-6 báz. RE sú prítomné u prokaryotov (baktérie a archebaktérie), kde sú súčasťou **restriktčno-modifikačného systému**, akoby prokaryotickej vrodenej imunity, slúžia

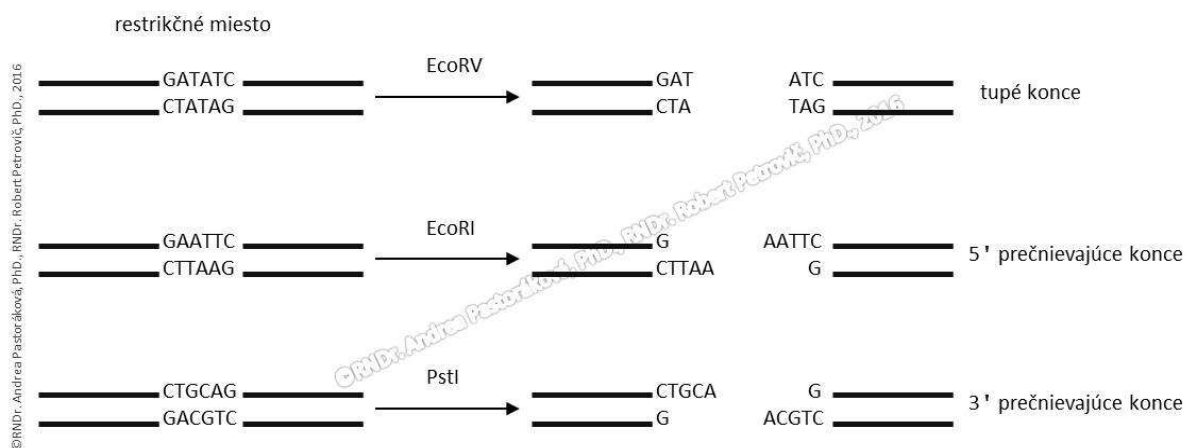
na ochranu pred cudzou DNA (napr. vírusovou), ktorú po rozpoznaní špecifickej sekvencie štiepia.

Restriktčno-modifikačný systém má dve zložky:

1) modifikačné enzýmy - metylázy, ktoré procesom metylácie modifikujú určité bázy svojej DNA, čím ich označia za vlastnú DNA, takže takáto DNA je potom rezistentná voči štiepeniu restriktčnými endonukleázami. Najčastejším spôsobom metylácie u baktérií je metylácia adenínu na N6, pričom vznikne metyladenín, alebo cytozínu na C5, metylcytozín;

2) restriktčné endonukleázy štiepia špecifické miesto dvojvláknovej DNA, ktoré je tvorené symetrickou sekvenciou zrkadlovo sa opakujúcich nukleotidov – tzv. **palindróm**. Restriktčné enzýmy sa používajú na štiepenie DNA sekvencie na mieste špecifickom pre tú ktorú restriktčnú endonukleázu napr. pri analýze polymorfizmov dĺžky restriktčných fragmentov (RFLP), analýze jednonukleotidových polymorfizmov (SNP), mutácií, ako aj pri klonovaní DNA do vhodných vektorových DNA molekúl.

Po štiepení dvojvláknovej DNA restriktčnou endonukleázou môžu vzniknúť tri typy koncov - 5'-prečnievajúce konce (lepivé), 3'-prečnievajúce konce (lepivé) a tupé konce (obr. 24).



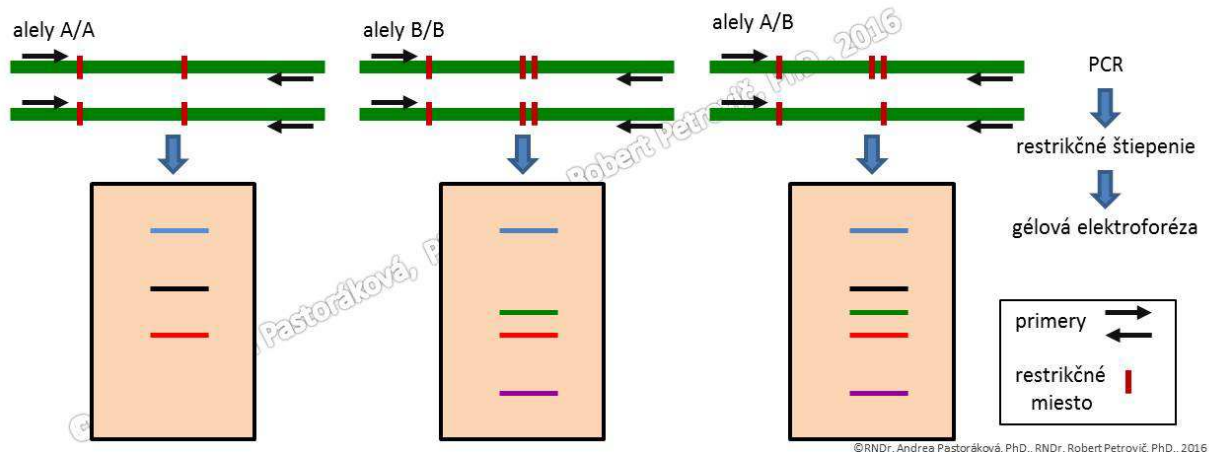
Obr. 24. Restriktčné štiepenie zanechávajúce rôzne konce: tupé a lepivé

Restriktčné štiepenie je často používanou metódou génových manipulácií na konštrukciu hybridných molekúl DNA s následným klonovaním.

Priebeh RFLP analýzy je nasledovný: restriktčná endonukleáza sa pridá k DNA a zmes sa vo vhodných reakčných podmienkach (pufor, teplota) inkubuje niekoľko hodín. Počas inkubácie dôjde k štiepeniu DNA na špecifických miestach. DNA je potom elektroforeticky separovaná v géli a následne vizualizovaná. V minulosti po gélovej elektroforéze nasledoval **Southern blot** (čiže prenos separovaných fragmentov DNA z gélu na špeciálnu membránu) (obr. 35), po ktorom nastala vizualizácia rádioaktívne značenou próbou. V súčasnosti sa kvôli práci a zdravotným rizikám od Southern blotu upúšťa a prechádza sa na rýchlejšie, menej prácne a zdravotne šetrnejšie metódy priateľskejšie aj k životnému prostrediu.

RFLP bola prvou metódou používanou na zistenie DNA profilu (DNA fingerprinting), mapovanie génov zapríčiňujúce genetické ochorenia a testovanie otcovstva. Väčšina RFLP markerov je vysoko lokusovo špecifických a kodominantných (obidve alely sú detekované u heterozygota).

PCR-RFLP je laboratórne prístupnejšia metóda molekulárno-genetickej diagnostiky, keďže PCR umožňuje amplifikáciu veľmi malých množstiev DNA. Alternatívny názov používaný v literatúre je CAPS z angl. **C**leaved **A**mplified **P**olymorphic **S**equences assay. Použitím špecifických primerov dôjde PCR metódou k amplifikácii požadovaného úseku DNA, ten sa potom štiepi restriktčnou endonukleázou vo vhodných podmienkach, následne sa štiepne produkty elektroforeticky separujú a vizualizujú použitím interkalačných farbív a UV svetla (obr. 25).



Obr. 25. Princíp metódy PCR-RFLP

4.3 VNTR a STR

V génome sú prítomné dva typy tandemových (za sebou nasledujúcich) opakovaní:

- 1) **minisatellite** – nazývané variabilný počet tandemových opakovaní **VNTR** (variable number of tandem repeats);
- 2) **mikrosatellite** tiež krátke tandemové repetície **STR** (short tandem repeats).

Obidva tieto typy satelitnej DNA sú rozmiestnené po celom génome, sú využívané hlavne vo forenzej genetike na identifikáciu osôb a určenie otcovstva poprípade materstva, ale aj v medicíne na detekciu chromozómových aneuploidií. Štruktúra obidvoch je podobná. Rozdiel medzi jednotlivými alelami je spôsobený rozdielnym počtom opakovaní opakujúcej sa sekvencie (motívu), čo spôsobí rôznu dĺžku alel s rôznym počtom tandemových opakovaní, nazývanú polymorfizmus dĺžky fragmentov.

VNTR – variabilný počet tandemových opakovaní, pričom opakujúca sa sekvencia má dĺžku od 6 do 100 báz, pričom sa môže opakovať aj tisíce krát, alely tak môžu mať od 500 do 30 000 báz. VNTR boli v kombinácii s RFLP (**DNA fingerprinting**) prvým polymorfizmom používaným na zistenie DNA profilov a identifikáciu osôb v kriminalistickej praxi. V súčasnosti jeho využitie v kriminalistike je kvôli potrebe relatívne veľkého množstva DNA nahradené využitím STR.

STR - krátke tandemové repetície sú v kriminalistike najčastejšie používaným polymorfizmom. STR lokusy sú rozmiestnené po celom génome, repetícia obsahuje jednu až šesť báz, pričom jej opakovaním vznikne STR v rozsahu od 50 do 300bp. V našom génome sú tisíce STR, ktoré môžu byť použité pre forenznú analýzu. V kriminalistike sa v súčasnosti na identifikáciu osôb používa 13 STR locusov, ktoré patria k medzinárodne uznávaným štandardom. Z iniciatívy FBI bola vytvorená databáza CODIS (**C**ombined **D**N*A* **I**ndex **S**ystem), každá krajina má svoju databázu CODIS, kde je možné vložiť a archivovať DNA profily jednotlivcov, ako aj profily DNA získaných z miest kriminálneho činu, v databáze je ich možné navzájom porovnať a tak zistiť pôvodcu trestného činu. Medzinárodná jednotnosť v používaní CODIS STR lokusov umožňuje v prípade potreby vzájomné porovnanie DNA profilov zistených na území rôznych štátov. CODIS STR lokusov je 13 a sú to CSF1PO, FGA, TH01, TPOX, VWA, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51 a D21S11. Zistenie DNA profilu sa uskutočňuje multiplexnou PCR reakciou s fluorescenčne značenými primermi špecifickými pre konkrétny STR. Následne sú PCR produkty analyzované kapilárnou elektroforézou genetickým analyzátorom, ktorý rozlíši amplifikované fragmenty na základe fluorescencie a dĺžky (fragmentačná analýza) (obr. 26, Tab. 3). DNA profil každého človeka je jedinečný, rovnaký profil môžu mať len jednovaječné dvojčatá.



©RNDr. Andrea Pastoráková, PhD., RNDr. Robert Petrovič, PhD., 2016

Obr. 26. Ukážka DNA profilu človeka: 15 STR lokusov s určením pohlavia pomocou lokusu pre amelogonín (ženské pohlavie - XX); malé oranžové píky predstavujú fragmenty veľkostného štandardu

Tabuľka č. 3: Zápis DNA profilu človeka z obrázka č. 26. : 15 STR lokusov s určením pohlavia pomocou lokusu pre amelogonín

System	Alela 1	Alela 2
D3S1358	16	17
TH01	9	9.3
D21S11	28	28
D18S51	15	18
Penta E	7	14
D5S818	9	12
D13S317	8	11
D7S820	8	11
D16S539	11	12
CSF1PO	10	11
Penta D	11	12
vWA	15	18
D8S1179	13	16
TPOX	8	9
FGA	20	21
amel	X	X

5. MLPA

Multiplexná amplifikácia prôb závislá od ligácie (z angl. **m**ultiplex **l**igation-**d**e~~p~~endent **p**robe **a**mplification) je metóda schopná v jednej reakcii (v jednej skúmavke a vzorke) detegovať zmeny v počte až 50 nukleotidových sekvencií. Metódou MLPA je možné rýchlo identifikovať amplifikácie (duplikácie) a delécie veľkého počtu génov, či už použitím DNA alebo mRNA, krvných vzoriek alebo vzoriek z nádorov.

Princíp MLPA spočíva v multiplexnej amplifikácii 50 špecifických nukleotidových sekvencií použitím jedného páru primerov, pričom jeden primer je fluorescenčne označený. Výsledné PCR produkty sú analyzované kapilárnou elektroforézou (fragmentačná analýza). Dĺžka každého namnoženého produktu je jedinečná, narastá postupne o 6 alebo 9 nukleotidov, pričom produkty PCR sú 120 – 500 nukleotidov dlhé. Tento veľkostný rozsah PCR fragmentov (dĺžka 120-500 nukleotidov s nárastom postupne o 6 alebo 9 nukleotidov) je optimálny pre kapilárnu elektroforézu. MLPA multiplexná PCR prebieha za použitia iba jedného páru primerov, ktoré amplifikujú špecifické sekvencie. Trik spočíva v tom, že nedochádza k amplifikácii DNA sekvencie ale MLPA prôb, ktoré sú pridané k vzorkám. Každá MLPA próba pozostáva z dvoch oligonukleotidov (dve hemipróby), pričom každý oligonukleotid obsahuje jednu zo sekvencie rozpoznávanú PCR primermi. Próba vznikne jedine za predpokladu hybridizácie dvoch oligonukleotidov (hemiprób) k cieľovej sekvencii (génu) a po ligácii enzýmom ligázou. Iba ligované próby sú exponenciálne amplifikované pomocou jedného páru primerov. Množstvo zligovaných prôb teda závisí od množstva cieľových sekvencií (génov) vo vzorke.

Postup MLPA analýzy je nasledovný (obr.27):

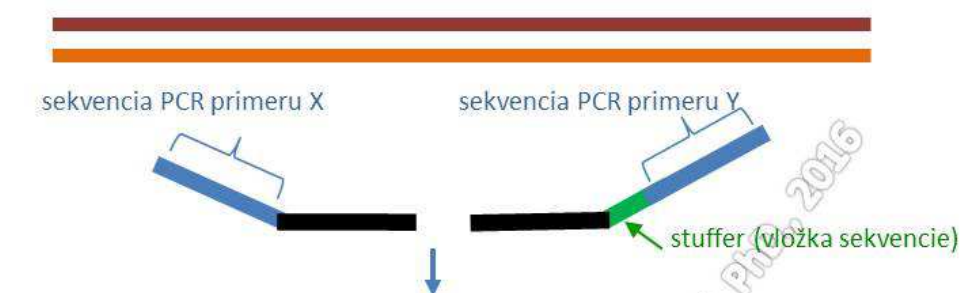
K vzorke nukleovej kyseliny (DNA resp. mRNA) sa pridá zmes 50 jedinečných prôb, každá próba je komplementárna k určitej cieľovej sekvencii NK vzorky. Každá próba však pozostáva z dvoch oligonukleotidov hybridizujúcich vedľa seba, zároveň každý oligonukleotid (hemipróba) obsahuje pridanú sekvenciu rozpoznávanú párom PCR primerov. Po hybridizácii oligonukleotidov (hemiprób) dochádza k ich ligácii ligázou. Ligačná reakcia je tak špecifická, že je schopná rozlíšiť sekvenciu líšiacu sa v jednom nukleotide. Výsledný ligačný produkt (próba) obsahuje obidve sekvencie pre PCR primery na jednom fragmente, čiže môže dôjsť k namnoženiu takéhoto fragmentu PCR reakciou. V prípade, ak nedôjde k ligácii príslušných hemiprób, pretože hemipróby nenájdu cieľovú sekvenciu na DNA, každá takáto nezligovaná hemipróba má len jednu sekvenciu rozpoznávanú len jedným PCR primerom, v dôsledku čoho nemôže prebehnúť jej PCR amplifikácia a počas fragmentačnej analýzy nie je detegovaná, pretože negeneruje fluorescenčný signál.

MLPA:

1. DNA denaturácia a hybridizácia s MLPA prôbami (hemipróby)
2. Ligácia (vytvorenie kompletných prôb)
3. PCR amplifikácia prôb párom primerov
4. Kapilárna elektroforetická separácia PCR produktov
5. Analýza dát

Pri MLPA analýze je dôležité okrem MLPA amplifikácie vzorky urobiť aj MLPA amplifikáciu referenčnej vzorky, ku ktorej sa bude porovnávať počet génov (cieľových sekvencií). Po kapilárnej elektroforéze MLPA referenčnej a skúmanej vzorky, porovnaním obsahu nameraných hodnôt tzv. píkov príslušných prôb sa určí relatívny počet kópií v skúmanej vzorke.

1. Denaturácia



2. Hybridizácia hemiprób



3. Ligácia



4. PCR s univerzálnymi primermi X a Y, amplifikácia iba zligovaných prób



5. Fragmentačná analýza, kvantifikácia amplifikovaných sekvencií



© RNDr. Andrea Pastorková, PhD., RNDr. Robert Petrovič, PhD., 2016

Obr. 27. Princíp MLPA

Firma MRC-Holland v súčasnosti ponúka stovky MLPA setov prób, ktoré sú vhodné na:

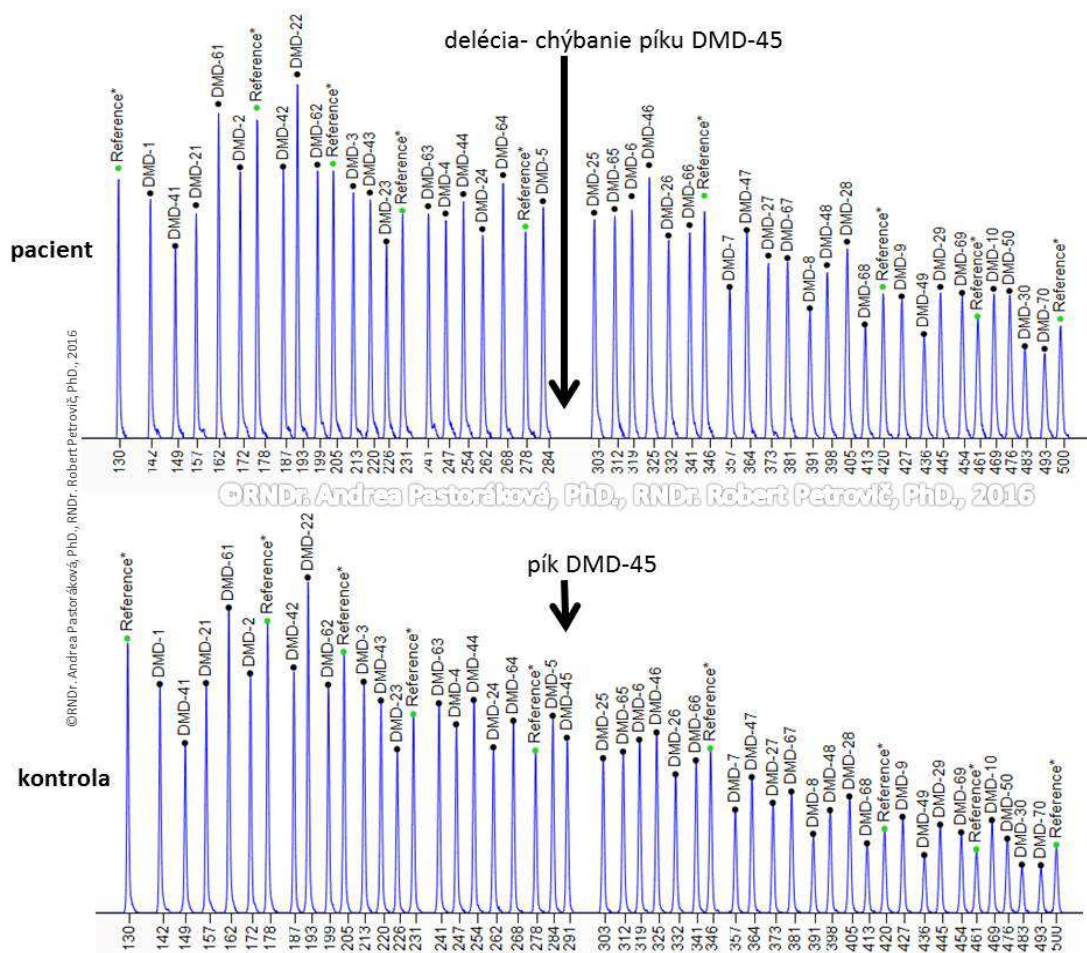
- 1) diagnostiku kongenitálnych a dedičných ochorení;
- 2) zisťovanie profilu nádorov;
- 3) zisťovanie metylačného profilu.

MLPA je metóda vhodná na detekciu malých prestavieb (BRCA1, BRCA2, MSH2, atď.), veľkých chromozómových prestavieb (Williamsov syndróm, Prader-Willi/Angelman syndróm atď.).

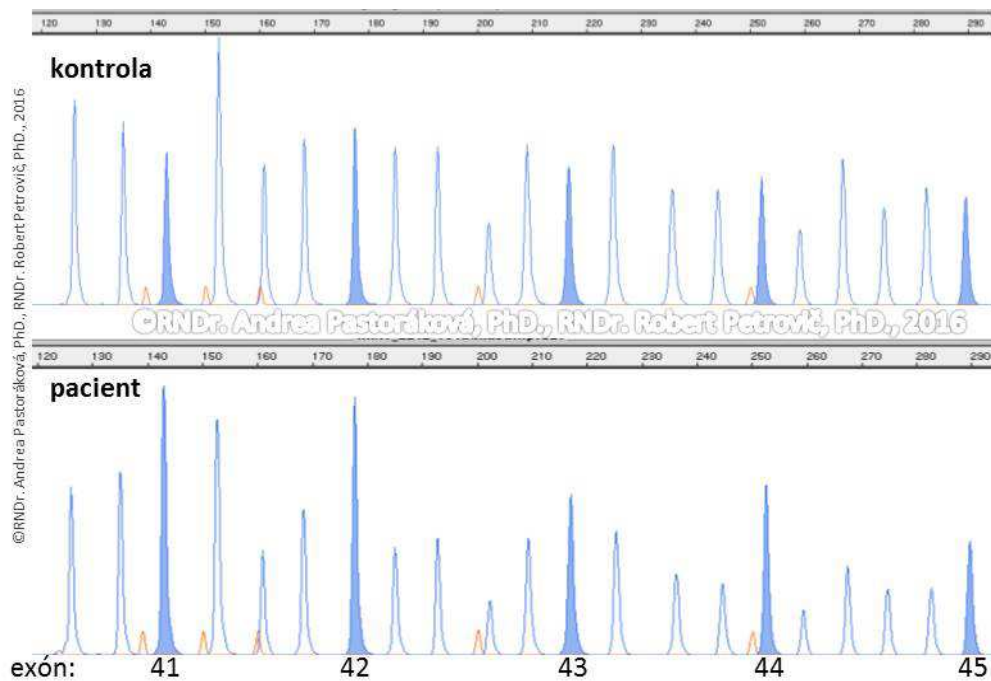
detekciu zmien v počte kópii génov (obr. 28, 29), ako aj zistenie počtu kompletných chromozómov (chromozóm 13, 18, 21, X,Y; tiež aj z amniovej tekutiny), diagnostiku nádorov (zmeny počtu pri ALL, CLL atď.), kvantifikáciu metylácie (Prader-Willi/Angelmanov syndróm, Fragilný X, inaktivácia nádorových supresorových génov atď.), mRNA analýzu génov zúčastňujúcich sa apoptózy alebo zápalov.

MS-MLPA (Methylation-Specific MLPA) je varianta MLPA určená špeciálne na analýzu aberantných metylácii imprintovaných oblastí, ako aj detekciu metylačných zmien CpG ostrovčekov lokalizovaných blízko promótora. Rozdiel oproti štandardnej MLPA spočíva v použití metylačne senzitívneho restriktčného enzýmu *HhaI*, ktorý štiepi MS-MLPA próby hybridizované k nemetylovanej sekvencii. Každá DNA vzorka určená pre MS-MLPA analýzu prejde dvoma reakciami: v jednej mikroskúmavke štandardnou MLPA analýzou (bez štiepenia metylačne senzitívnym enzýmom) a v druhej mikroskúmavke dôjde okrem ligácie prób aj k metylačne senzitívnemu štiepeniu hybridizovaných prób s nemetylovanou DNA. Amplifikujú sa len ligované próby, po PCR amplifikácii sa fragmentačnou analýzou porovnaním oboch reakcií zistia rozdiely v metylačnom profile vzorky k referenčnej vzorky.

RT-MLPA (Reverse Transkriptase MLPA) je variácia MLPA určená pre zistenie mRNA profilu vzorky, je alternatívou k real-time PCR a mikročipom. RT-MLPA nedeteguje mRNA množstvo priamo, pretože používaná ligáza nie je schopná ligovať DNA oligonukleotidy, keď sú hybridizované s RNA. Preto RT-MLPA začína reverznou transkripciou so špeciálne navrhnutými RT primermi, tak aby vytvorili krátke oligonukleotidy (cDNA). Potom reakcia pokračuje ako štandardná MLPA.



Obr. 28. MLPA analýza génu *DMD* (kódujúceho dystrofín), mutácie ktorého spôsobujú Duchennovu svalovú dystrofiu, u pacienta je prítomná delécia exónu 45 v porovnaní s referenčnou vzorkou – kontrolou



Obr. 29. MLPA analýza génu DMD (kódujúceho dystrofín), mutácie, ktorého spôsobujú Duchennovu svalovú dystrofiu, u pacienta sú prítomné duplikácie exónov 41, 42, 43, 44, 45 (píky vo vzorke pacienta sa porovnajú s píkmi v kontrole – referenčnej vzorke)

6. Sekvenovanie

Sekvenovaním rozumieme určenie primárnej štruktúry DNA, teda určenie poradia nukleotidov v reťazci DNA. Začiatky moderného sekvenovania siahajú do roku 1977, kedy boli objavené dve metódy sekvenovania:

1) chemická metóda Maxama a Gilberta;

2) enzymatická metóda Sangera, Nicklena a Coulsona.

Princíp obidvoch metód sekvenovania spočíva v tom, že sa vytvorí súbor DNA molekúl s rôznou veľkosťou, ktoré sú zakončené konkrétnym nukleotidom, tieto DNA molekuly sa elektroforeticky separujú v géloch s rozlišovacou schopnosťou 1 nukleotid.

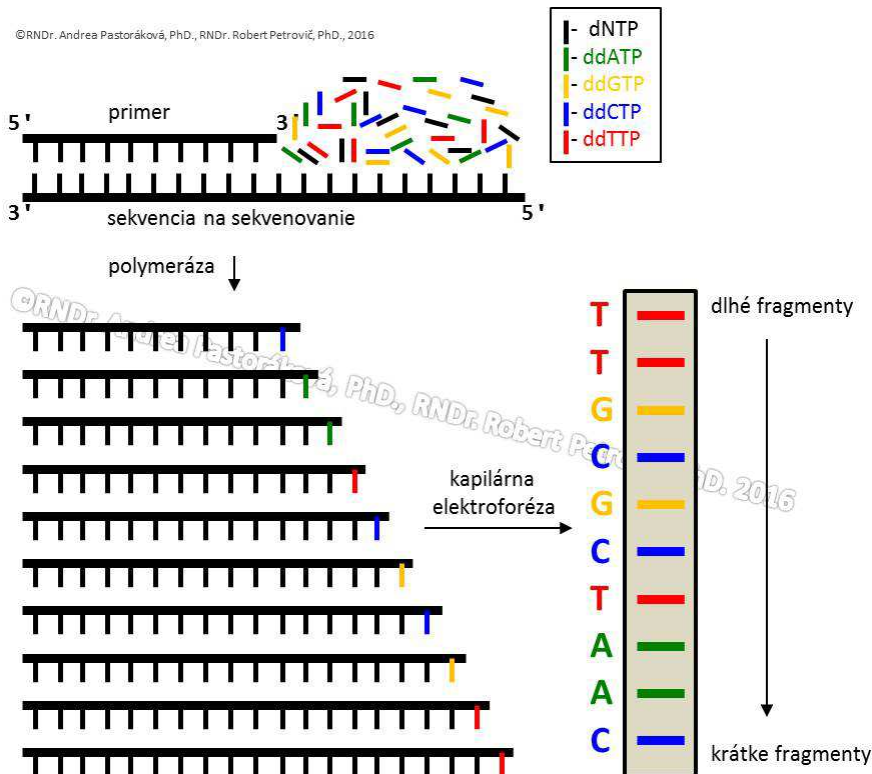
6.1 Chemická metóda

DNA molekuly sa na 5'-konci rádioaktívne označia rádioaktívnym fosforom a následne sa chemicky modifikujú špecificky pre každú bázu. DNA sa potom v modifikovaných miestach štiepi, čím vzniknú rôzne dlhé fragmenty, pričom podmienky sú nastavené tak, aby sa DNA na každom mieste štiepila len raz. Modifikácia DNA a štiepenie prebehne v štyroch separátnych reakciách (skúmvkách), takže po elektroforetickej separácii takto opracovanej DNA v štyroch dráhach polyakrylamidového gélu a následnej autorádiografii (podobne ako pri Southernovej hybridizácii) je možné odčítať nukleotidovú sekvenciu približne 100 nukleotidov od rádioaktívneho označenia (v čase objavu Maxama a Gilberta).

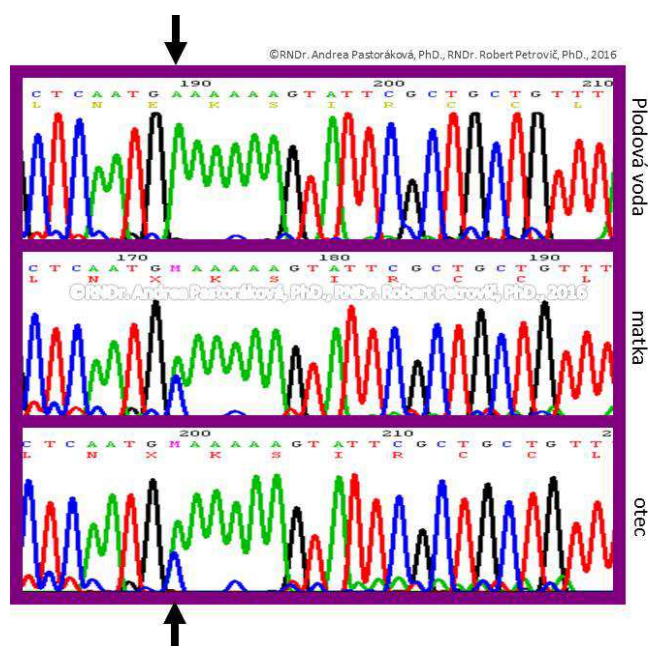
6.2 Sangerova metóda

Základy metódy boli popísané už v roku 1975 (metóda plus a mínus), ale až vylepšenie použitím **dideoxynukleotidov** (ddNTP) v roku 1977 došlo k zjednodušeniu sekvenovania. Princípom enzýmoveho sekvenovania je terminácia (zastavenie) polymerizácie inkorporáciou 2', 3'-dideoxynukleotidov do novosyntetizujúceho sa vlákna DNA. Keďže ddNTP neobsahujú hydroxylovú skupinu na 3' uhlíku ribózy, nemôžu sa zúčastniť na tvorbe fosfodiesterovej väzby, nemôže sa pripojiť k nim ďalší nukleotid, čiže musí dôjsť k terminácii polymerácie. Reakcia prebieha v štyroch skúmvkách s rádioaktívne značeným primerom. V každej skúmvke sú prítomné všetky štyri deoxynukleotidtrifosfáty (dNTP), ale pre každú skúmvku je špecifický prídavok malého množstva jedného z dideoxynukleotidtrifosfátov (v prvej skúmvke je ddATP, v druhej ddCTP, v tretej ddTTP a vo štvrtjej ddGTP). Malé množstvo ddNTP spôsobí, že pri polymerizácii dochádza k prednostnému zaradeniu štandardných dNTP do narastajúceho reťazca a len občas sa inkorporuje ddNTP, čím sa zastaví syntéza reťazca. V každej skúmvke tak vznikne súbor DNA fragmentov rôznych veľkostí zakončených príslušným ddNTP (v prvej skúmvke ddATP, v druhej ddCTP, v tretej ddTTP a vo štvrtjej ddGTP). Po elektroforetickej separácii v 4 dráhach polyakrylamidového gélu a autorádiografii sa z autorádiogramu odčíta sekvencia.

V súčasnosti je sekvenovanie do značnej miery automatizované, pričom využíva princíp Sangerovej enzýmovej metódy s určitými obmenami. Úsek DNA, ktorý treba sekvenovať sa prostredníctvom termostabilných DNA polymeráz namnoží PCR metódou, po ktorej nasleduje sekvenačná reakcia (asymetrická PCR) s fluorescenčne značenými ddNTP (každý druh označený iným fluorescenčným farbivom). Sekvenačná reakcia prebieha v jednej skúmvke s jedným primerom, vznikne tak súbor jednovláknových DNA rôznej dĺžky, ktoré sú na 3'-konci označené ddNTP so špecifickým fluorescenčným farbivom. Táto metóda sekvenovania sa tiež nazýva "dye-terminator cycle sequencing"(obr. 30). Po kapilárnej elektroforéze vzorky v genetickom analyzátoe, zaznamenávaní fluorescencie jednotlivých fragmentov CCD kamerou a softvérovom spracovaní sa získa sekvencia DNA (obr. 31).



Obr. 30. Princíp sekvenovania, Sangerova dideoxy metóda alebo tzv. chain termination method (reťazec zastavujúca metóda)



Obr. 31. Určenie genotypu plodu a rodičov sekvenčnou analýzou DNA získanej z plodovej vody (prenatálna diagnostika) a periférnej krvi, sekvenčná analýza génu *ASPA*, výsledok: u plodu prítomná mutácia c. 914C>A v homozygotnom stave (AA), rodičia heterozygoti (AC). Uvedená mutácia je v homozygotnom stave kauzálnou príčinou Canavanovej choroby

Automatizované sekvenovanie prináša viaceré výhody oproti klasickej Sangerovej metóde: vyššiu presnosť a rýchlosť, v jednej sekvenačnej reakcii možnosť osekvenovať až 1200 nukleotidový fragment, malé množstvo templátu potrebné na analýzu.

6.3 Next Generation Sequencing (NGS)

NGS (sekvenovanie novej generácie) má obrovský potenciál v analýze genómov, pričom toto označenie zahŕňa viaceré technologické metódy reprezentované niekoľkými firmami. Princípom je masívne paralelné sekvenovanie, čím sa získajú rádovo tisíce až milióny sekvencií naraz.

6.3.1 Sekvenovanie druhej generácie

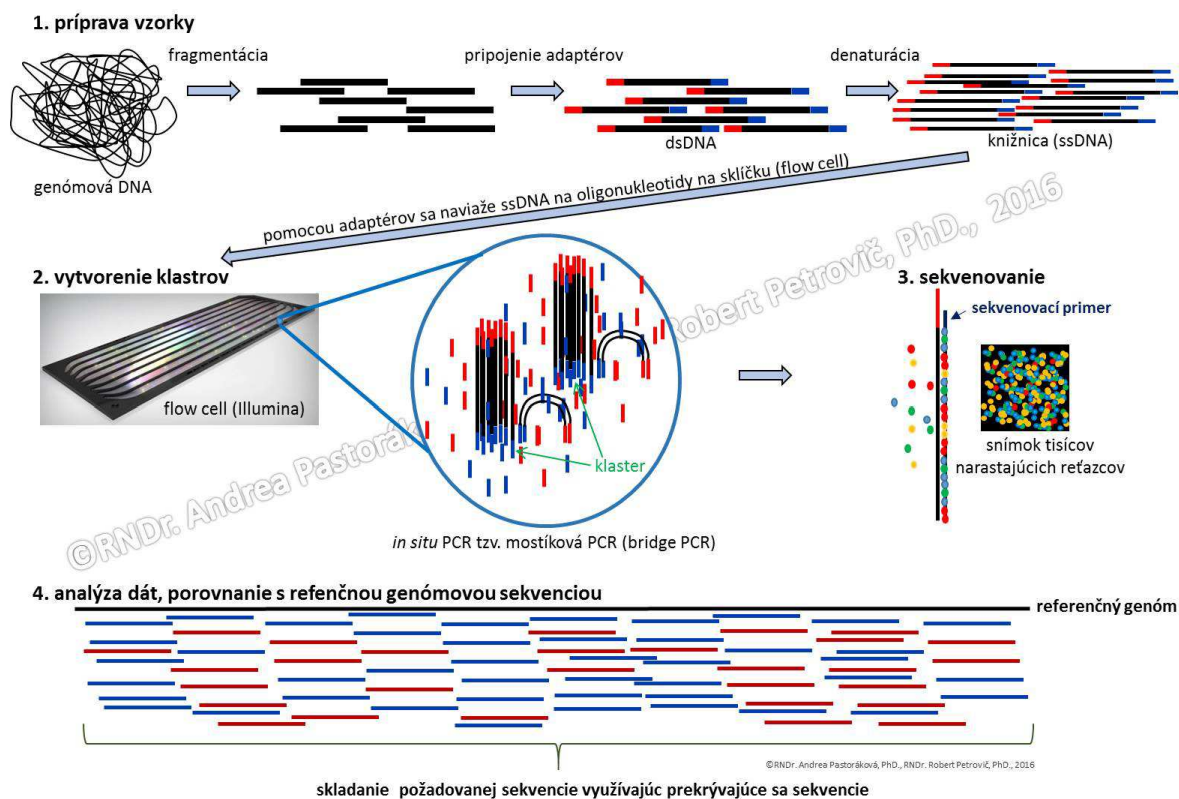
Na začiatku sa analyzovaná DNA vo väčšine prípadov **fragmentuje** (vznikne tak **DNA knižnica**), na fragmenty sa pripoja krátke sekvencie – **adaptéry**, následne sa tieto fragmenty rôznymi prístupmi **amplifikujú** a určí sa ich **sekvencia**. Vďaka čiastočným prekryvom je zo získaných sekvencií možné poskladať plynulú sekvenciu zodpovedajúcu pôvodnej nefragmentovanej DNA.

Pyrosekvenovanie je podobne ako Sangerova metóda založená na princípe syntézy komplementárneho vlákna DNA, avšak rozdiel je v tom, že sa na detekciu inkorporácie nukleotidu využíva iný systém tvorby luminiscenčného signálu v priebehu reakcie. Pyrosekvenovanie je umožnené vďaka aktivite 4 enzýmov - DNA polymerázy, ATP sulfurylázy, luciferázy a apyrázy. Reakčná zmes obsahuje aj ďalšie komponenty - enzymatické substráty: adenosínfosfosulfát (APS), d-luciferín, sekvenovaný templát a cyklicky postupne po jednom type pridávané nukleotidtrifosfáty. Po zabudovaní nukleotidu do novovznikajúceho reťazca dôjde k uvoľneniu pyrofosfátu, následne je využitý ATP sulfurylázou na syntézu ATP z APS, počas ďalšej reakcie dôjde k využitiu ATP luciferázou na premenu luciferínu na oxyluciferín, čo spôsobí svetelný signál a ten zaznamená detekčný systém. Poslednou enzymatickou reakciou je reakcia apyrázy, ktorá odstráni nezainkorporované nukleotidy a nevyužité ATP, aby sa celý proces mohol zopakovať s reakčnou zmesou obsahujúcou ďalší nukleotidtrifosfát (iný ako v predchádzajúcej reakcii). Po každej reakcii detektor zaznamenáva emisiu svetla, na základe intenzity svetla je možné určiť, či bol vradený príslušný nukleotidtrifosfát, či bol inkorporovaný jeden, prípadne viac rovnakých nukleotidtrifosfátov.

Zvýšenie výkonu **pyrosekvenovania** umožnila tzv. **emulzná PCR v mikročasticiach** a použitie platničky PicoTiterPlate®, toto sekvenovanie zaviedla firma Roche pod pojmom 454 pyrosekvenovanie v roku 2005. Na začiatku sa DNA fragmentuje na úseky dlhé 400-600 báz, dvojláknová fragmentovaná DNA sa liguje s adaptérmi, prostredníctvom nich sa naviaže na mikročastice, dvojláknové fragmenty sa oddelia, mikročastice s naviazanými jednovláknovými fragmentami sa premiešajú so zmesou oleja a roztoku, ktorý obsahuje všetky komponenty na úspešnú PCR. Týmto spôsobom sa okolo každej mikročastice vytvorí vlastný mikroreaktor, v ktorom prebehne amplifikácia fragmentu. Po PCR reakcii sa mikročastice prenesú do platničky PicoTiterPlate, v ktorej sa do jamky zmestí akurát jedna mikročastica a reakčné komponenty pyrosekvenačnej reakcie. PicoTiterPlate® má 1 600 000 jamiek, každá jamka má maximálny objem 75 picolitra. Platnička s mikročasticami sa vloží do sekvenačného systému – prístroja, v ktorom sa celé pyrosekvenovanie uskutoční. Chemiluminiscenčné signály, ktorých počas sekvenovania vznikajú milióny v priebehu hodiny, sú zachytené CCD kamerou a analyzované softvérom.

Firma Illumina predstavila inú technológiu. PCR amplifikácia a sekvenovanie sa uskutočňuje na sklíčku (flow cell). Fragmentácia DNA a pripojenie adaptérov prebieha za účasti transpozómov v procese nazvanom tagmentácia. Po hybridizácii fragmentov DNA na sklíčko prebehne v klastroch PCR amplifikácia (tzv. mostíková amplifikácia), sekvenácia prebieha za účasti rozdielne fluorescenčne značených a chemicky modifikovaných nukleotidov, pričom každý nukleotid emituje fluorescenciu s inou vlnovou dĺžkou. Na sklíčku prebieha paralelne až 6 miliárd sekvenácií (obr. 32).

Ďalšími možnosťami sekvenovania druhej generácie je systém **SOLid** (vyvinutý firmou Applied Biosystem, dnes pod Thermo Fisher Scientific) a **Ion Semiconductor Sequencing** – polovodičové iónové sekvenovanie (od firmy Ion Semiconductor Sequencing v súčasnosti Thermo Fisher Scientific).



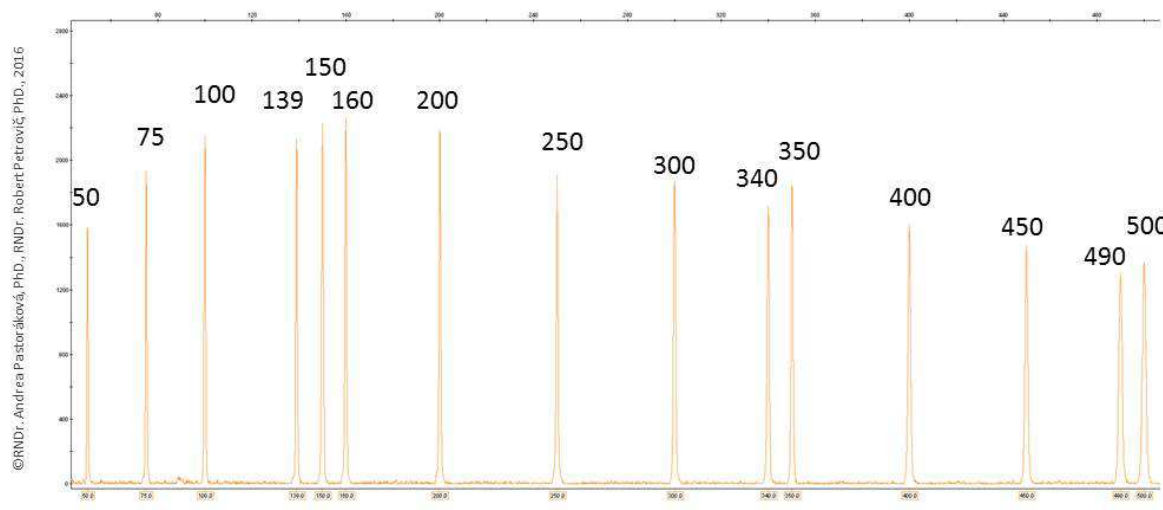
Obr. 32. Princíp sekvenovania novej generácie od firmy Illumina, PCR amplifikácia a sekvenovanie sa uskutočňuje na sklíčku (flow cell), paralelne prebieha až 6 miliárd sekvenácií

6.3.2 Sekvenovanie tretej generácie

Pred sekvenovaním netreba amplifikovať DNA PCR metódou ale sekvencia sa získava zachytením signálu v reálnom čase. Medzi sekvenovanie tretej generácie patrí SMRT (Single Molecule Real-Time Sequencing) a Nanopore Sequencing.

7. Fragmentačná analýza DNA

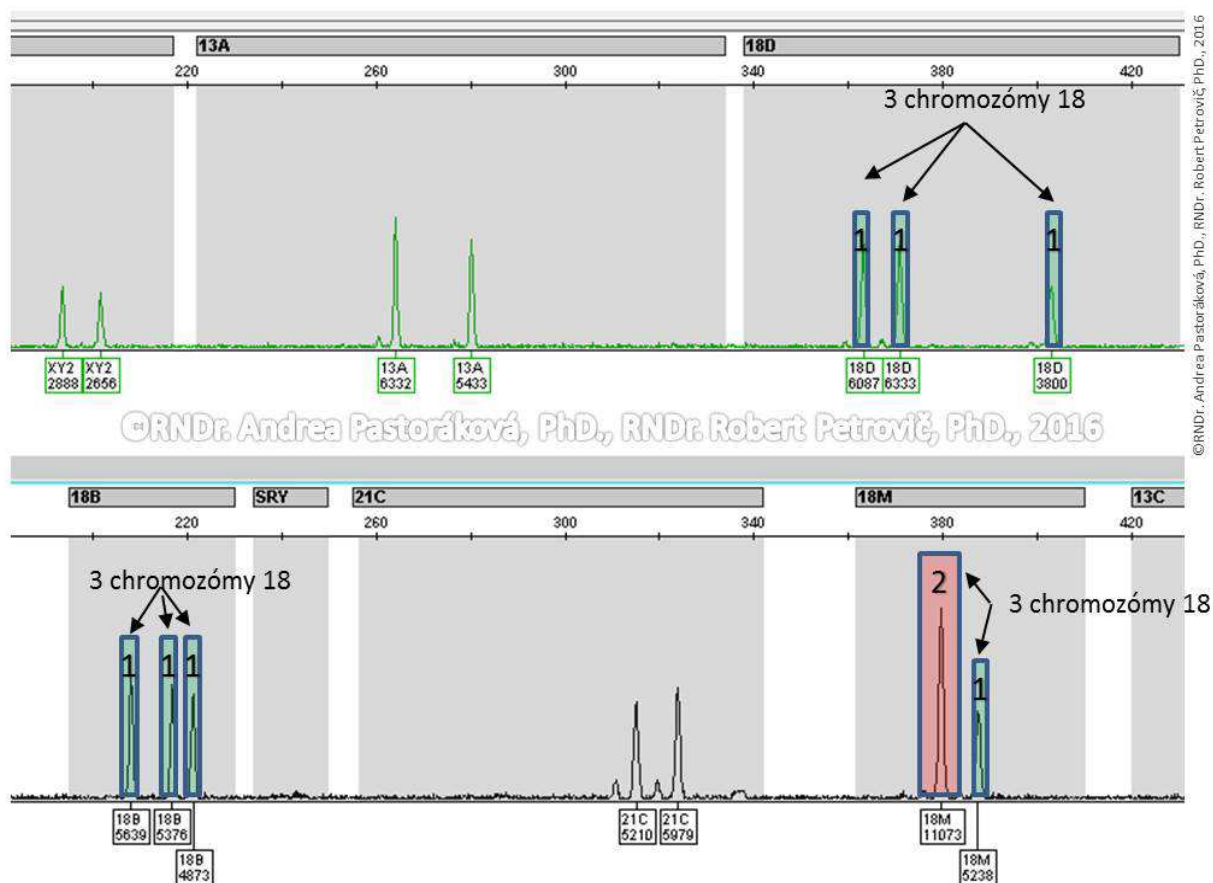
Je metóda používaná na určenie veľkosti fragmentov DNA získaných PCR reakciou. Dĺžka amplifikovaných DNA fragmentov sa zistí ich porovnaním s **veľkostným štandardom** (obr. 33), ktorý je tvorený DNA fragmentami známej dĺžky. Veľkostný štandard je pred kapilárnou elektroforézou zmiešaný so vzorkou. DNA fragmenty veľkostného štandardu sú fluorescenčne označené, pričom použité fluorescenčné farbivo je iné ako fluorescenčné farbivo použité na označenie DNA fragmentov vo vyšetrovanej vzorke.



Obr. 33. Elektroforetogram veľkostného štandardu používaného na určenie veľkostí fragmentov analyzovaných kapilárnou elektroforézou v genetickom analyzátoe (GeneScan™ 500 LIZ™ dye Size Standard), dĺžka fragmentov v nukleotidoch (napr. 50 nukleotidov)

Fragmentačná analýza pozostáva z viacerých krokov. Prvým je **izolácia DNA**, nasleduje **PCR amplifikácia**, počas ktorej sa novosyntetizované DNA fragmenty označia **fluorescenčnými farbivami**. Vzorka s **PCR produktom sa pripraví na kapilárnu elektroforézu**, tak že sa zmieša s veľkostným štandardom (slúži na určenie veľkosti fragmentov) a denaturačnou látkou (formamid), nasleduje denaturácia. Pripravené vzorky sú injektované do prístroja (**genetický analyzátor**), kde v kapiláre naplnenej polymérom v elektrickom poli migrujú fluorescenčne značené fragmenty DNA na základe veľkosti (**kapilárna elektroforéza**). Počas elektroforézy genetický analyzátor zaznamenáva fluorescenciu fragmentov. **Analýzou dát** prostredníctvom špeciálnych softvérov sa získajú **elektroforetogramy**, z ktorých je možné zistiť veľkosť fragmentov, ako aj typ fluorescencie (dôležité ak sú genetické varianty rozlíšiteľné rôznou fluorescenciou napr. SNaPshot).

Fragmentačná analýza je súčasťou množstva molekulárno-genetických metód (pozri obr. 12, 26, 28, 29, 34) ako sú napr.: STR analýza (Short Tandem Repeat), AFLP analýza (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP/T-RFLP analýza (Restriction Fragment Length Polymorphism/Terminal Restricted Fragment Length Polymorphism), SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), VNTR (Variable Number of Tandem Repeat), analýza straty heterozygotnosti (LOH, loss of heterozygosity), MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification), MSMSA (Methylation-Sensitive Mobility Shift Assay), SNP genotypovanie (SNaPshot®), HiCEP (High-Coverage Expression Profiling).



Obr. 34. Kvantitatívna fragmentačná PCR analýza (QF-PCR) DNA izolovanej z plodovej vody, výsledok prenatalnej analýzy = prítomnosť troch píkav pre chromozóm 18 (u všetkých fragmentov detegujúcich chromozóm 18 je pomer vyšetrovaných markerov aberantný 2:1 resp. 1:1:1), čo znamená trizómiu chromozómu 18, Edwardsov syndróm

8. Metódy založené na princípe hybridizácie

Nukleové kyseliny majú schopnosť vytvárať dvojvláknové reťazce z jednovláknových molekúl na základe komplementarity báz. Komplementarita báz umožňuje replikáciu DNA, transkripciu RNA, komplementarita báz zabezpečuje teda reprodukovateľnosť živej hmoty.

Hybridizácia je proces, v ktorom na základe komplementarity báz dochádza k vytvoreniu dvojvláknovej nukleovej kyseliny z dvoch jednovláknových molekúl DNA alebo RNA alebo ich kombináciou DNA, RNA, pričom kratšia jednovláknová nukleová kyselina vystupuje ako **sonda (próba)**. Hybridizácia nukleových kyselín je jeden z najpoužívanejších nástrojov v molekulárnej biológii a genetike (hybridizácia primerov alebo prób sa využíva v takmer každej metóde - v PCR, RT-PCR, qPCR, RT-qPCR, MLPA, sekvenovaní, fragmentačnej analýze, FISH, DNA mikročipoch atď.).

Denaturácia nukleových kyselín je proces, pri ktorom dochádza k porušeniu vodíkových väzieb medzi vláknami nukleových kyselín (strata sekundárnej a terciálnej štruktúry), tak že dôjde k ich úplnému oddeleniu, vzniknú jednovláknové reťazce. Denaturácia NK môže byť spôsobená vplyvom vysokých teplôt, pH alebo chemických látok (denaturačné činidlá). **Renaturácia** je opačný proces, v ktorom na základe komplementarity dochádza k tvorbe dvojvláknových NK.

Hybridizačná sonda (próba) je jednovláknová nukleová kyselina určitej známej dĺžky a sekvencie (najčastejšie DNA pretože je stabilnejšia ako RNA), ktorá je značená a slúži na detekciu komplementárnych molekúl DNA alebo RNA v procese hybridizácie. V závislosti od podmienok hybridizácie (stringencia) môže byť detegovaná sekvencia úplne komplementárna alebo v menej prísnych podmienkach môže mať sekvenčné odchýlky. Próba slúži na vyhľadanie a zviditeľnenie cieľových NK. Zviditeľnenie sa deje prostredníctvom označenia próby ešte pred hybridizáciou. Značenie próby môže byť **rádioaktívne** a **nerádioaktívne** (najčastejšie **fluorescenčné**).

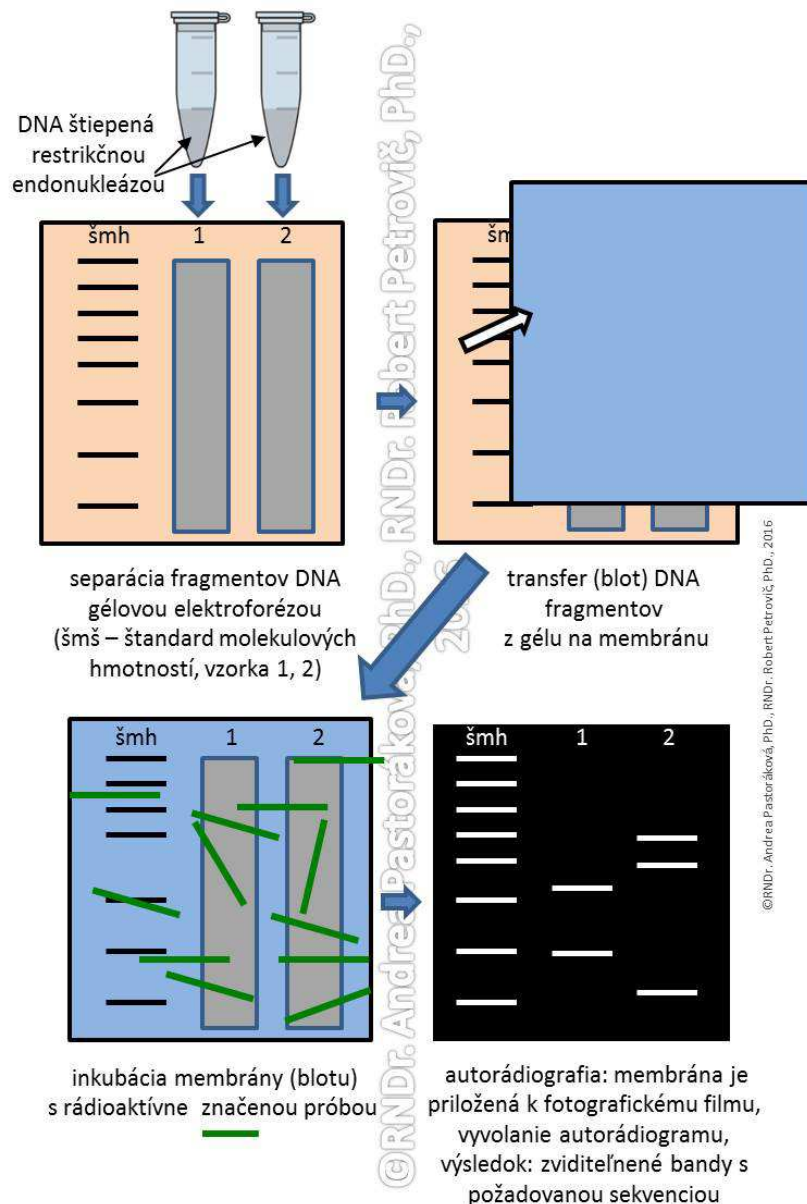
Rádioaktívne značené próby pomocou izotopov (^{32}P) sa využívali viac v minulosti, v súčasnosti sú kvôli zdravotným rizikám, ohľaduplnosti k životnému prostrediu, ako aj kvôli jednoduchšej manipulácii používané fluorescenčne značené próby. Rádioaktívne značené sondy boli používané hlavne metódou **Southernovej hybridizácie** (Southern blotting, Southern blot). Citlivosť rádioaktívne značených prób je vyššia, dosahuje schopnosť zachytiť 10 fg (femtogram 10^{-15}) cieľovej DNA sekvencie.

8.1 Southern blot

Metódu objavil v roku 1975 britský biológ Edwin Southern (preto Southern). Pri Southernovej hybridizácii sa restriktčne štiepené fragmenty DNA elektroforeticky separujú v géli, potom sa metódou blottingu prenesú na nylonovú alebo nitrocelulózovú membránu, kde sú následne hybridizované v roztoku obsahujúcom rádioaktívne značenú sondu. Priložením fotografického filmu k membráne a vyvolaním filmu, **autorádiografiou**, dôjde k zviditeľneniu lokalít, kde došlo k hybridizácii rádioaktívne značenej sondy s fragmentom DNA (autorádiogram). **Southern blot** bol kľúčovou a prvou metódou na identifikáciu osôb (DNA fingerprinting, DNA profiling) (obr. 35).

Okrem Southern blotu existuje **Northern blot** na analýzu RNA (génovej expresie) a **Western blot** na analýzu proteínov, postup je obdobný ako pri Southern blote s obmenami špecifickými pre konkrétny blot. Pri Northern blote sa používajú hybridizačné próby, ale pre vizualizáciu proteínov western blotom je potrebné použiť protilátky s následnou vizualizáciou. Pomenovanie techník je hra so slovíčkami (keďže pán Northern ani Western neobjavili takto nazvané techniky).

Nerádioaktívne značenie prób používaných v molekulárnej genetike môže byť nepriame (použitie haptenu) alebo priame. Konečná vizualizácia je najčastejšie zabezpečená fluoreskujúcimi farebnými značkami, farbivami, **fluorochrómmi (fluorofórmi)**. Pri priamom značení je farbička kovalentne naviazaná na nukleotid a na zachytenie fluorescencie sú potrebné špeciálne prístroje umožňujúce excitáciu farbičky, ktorá potom emituje žiarenie určitej vlnovej dĺžky (emisné žiarenie), a to zachytí detekčný systém prístroja. Využitie **fluorochrómov** v molekulárnej genetike je masívne napr. na vizualizáciu NK elektroforeticky separovaných v géli, kvantifikáciu produktov PCR reakcie v prístroji real-time PCR cyklér, sekvenovaní, fragmentačnej analýze, FISH, DNA mikročipoch atď.



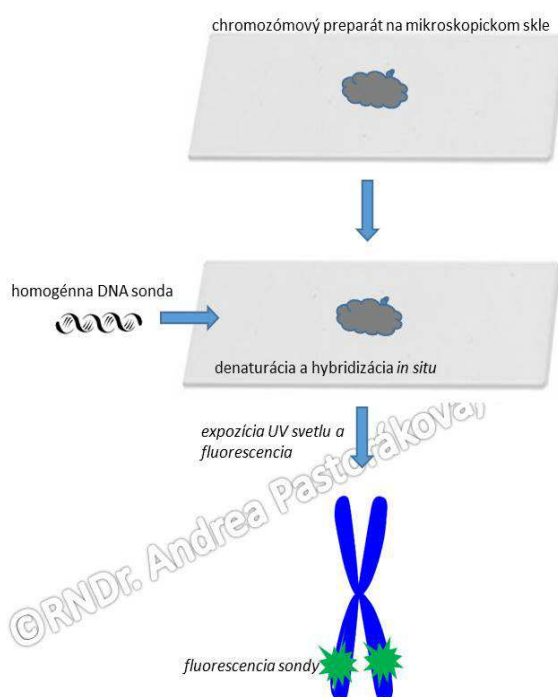
Obr. 35. Princíp Southern blotu

8.2 FISH (fluorescenčná *in situ* hybridizácia)

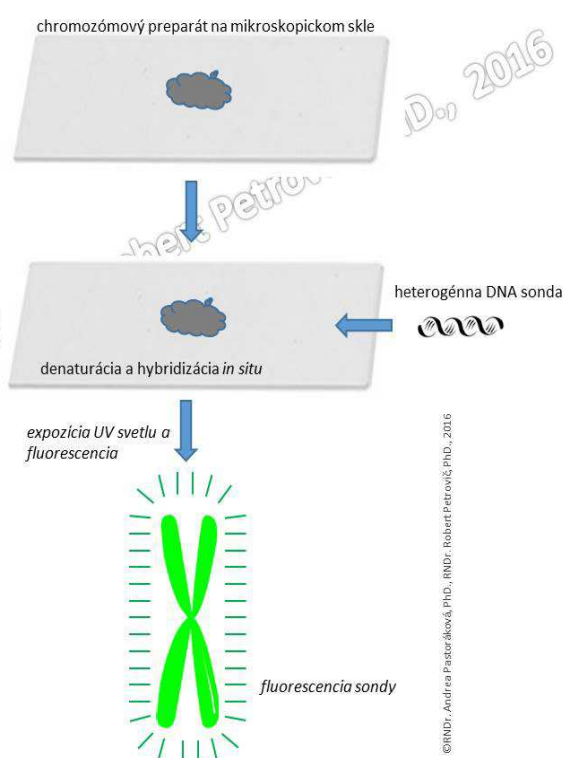
FISH (fluorescent *in situ* hybridization, fluorescenčná *in situ* hybridizácia) metóda patrí medzi molekulovo-cytogenetické techniky. Princíp FISH metódy je založený na hybridizácii fluorescenčne značených prôb ku komplementárnym úsekom vyšetrovanej DNA na podložnom skle (priamo na mieste - *in situ*). K denaturácii dsDNA dochádza buď vplyvom denaturačných činidiel alebo zvýšenou teplotou a následnou renaturáciou dochádza k naviazaniu sondy na komplementárny úsek DNA. Výsledok hybridizácie sa vizualizuje fluorescenčným mikroskopom vybaveným vhodnými fluorescenčnými filtrami a vizuálne zhodnotí skúseným odborníkom. Fluorescencia sa v niektorých prípadoch môže zaznamenať a hodnotiť aj pomocou softvéru (obr. 36).

Pomocou FISH detegujeme numerické aberácie - zmeny v počte chromozómov (napr. trizómia, monozómia chromozómov) alebo štruktúrne aberácie a prestavby (napr. translokácie, inverzie, delécie, duplikácie, amplifikácie). FISH metóda umožňuje identifikáciu a detekciu každého ľudského chromozómu, jeho zaradenie do karyotypu, odhalenie malých submikroskopických chromozómových zmien a tiež mapovať pozície jednotlivých génov na chromozóme.

A) štandardná chromozómová FISH



B) maľovanie celého chromozómu, chromosome painting



Obr. 36 Princíp štandardnej FISH a FISH maľovania celého chromozómu

Veľkou výhodou FISH metódy je možnosť analýzy buniek v metafáze aj v interfáze, kedy nie je nutná kultivácia buniek a tiež rýchle analyzovanie veľkého počtu buniek (stovky až tisíce). K ďalším výhodám patrí bezpečnosť, vysoká citlivosť, dostatočná stabilita, relatívne krátky čas hybridizácie a možnosť rýchleho vyhodnotenia. Hybridizácia pri väčšine súčasne dodávaných sond trvá 10-12 hodín (na trhu sú už dostupné aj sondy so skráteným časom hybridizácie na 2-3 hodiny). Po hybridizácii nasleduje odmyvanie, kedy pri príslušnej teplote dochádza k odmytiu nenašielaných a nesprávne hybridizovaných sond. Preparát sa následne podfarbí a výsledok sa zhodnotí vo fluorescenčnom mikroskope. Na podfarbenie chromozómov alebo jadier sa používa modré kontrastné farbivo DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol), ktoré má silné fluorescenčné vlastnosti, dokáže prechádzať jadrovou membránou a viazať sa na DNA. Výsledkom je modré zafarbenie, ktoré výborne kontrastuje so signálmi jednotlivých sond.

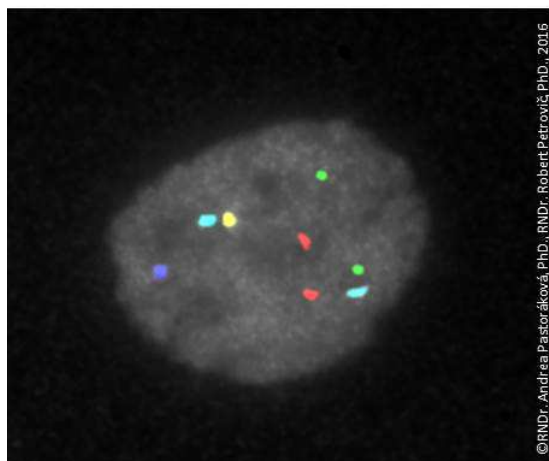
Limitujúcim faktorom FISH je možnosť identifikácie len tých úsekov DNA, ku ktorým sú použité sondy. V jednej analýze je možné použiť najviac 3 odlišne značené sondy, a tak zistiť prípadné abnormality len na 1 alebo na pár lokusoch. Na relevantnú detekciu je potrebné mať vo vzorke 1-5% aberantných interfázových jadier.

FISH je možné uskutočniť na širokej škále biologického materiálu: na vzorkách periférnej krvi, kostnej drene, náteroch, choriových klkoch, plodovej vode, rôznych druhov tkanív natívných alebo zaliatých v parafíne, na 1 bunke (predimplantačná genetická diagnostika, PGD) (obr. 37).

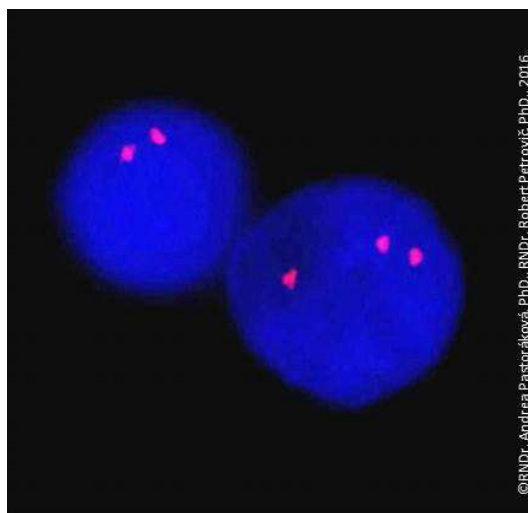
Využíva sa na detekciu aberácií pri mnohých onkologických ochoreniach (napr. pri diagnóze mnohopočetný myelóm sa v súčasnosti po separácii CD138+ buniek robí FISH s 5 sondami pre gény IGH, TP53, RB1, oblasť 1p32/1q21 a stanovuje sa hyperploidia chromozómov 5, 9 a 15) a tiež k spresneniu, doplneniu a k overeniu bežného cytogenetického vyšetrenia.

Podľa miesta na chromozóme, na ktorom dochádza k hybridizácii sondy, rozlišujeme 4 typy DNA sond:

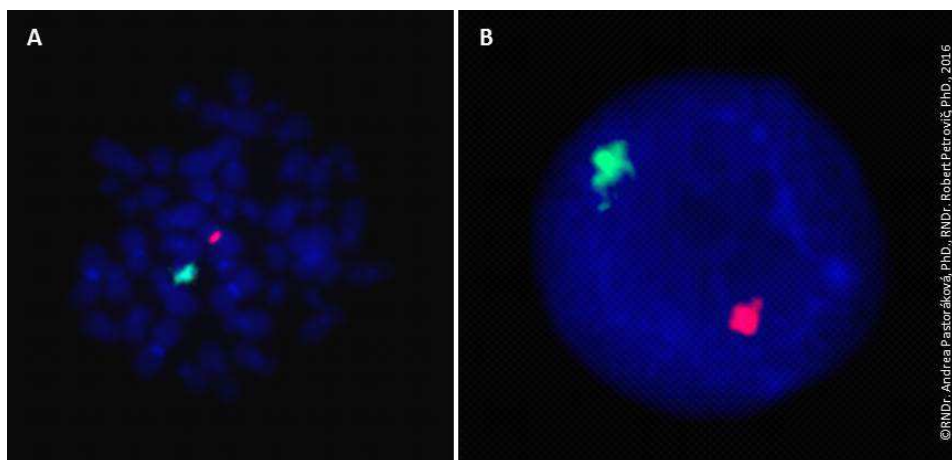
- **centromérové sondy** – sa viažu na strednú časť chromozómu – centroméru, slúžia k diagnostike zmien v počte chromozómov, k detekcii chromozómov neznámeho pôvodu, umožňujú interfáznu FISH na nedeliacich sa bunkách (obr. 38-41);



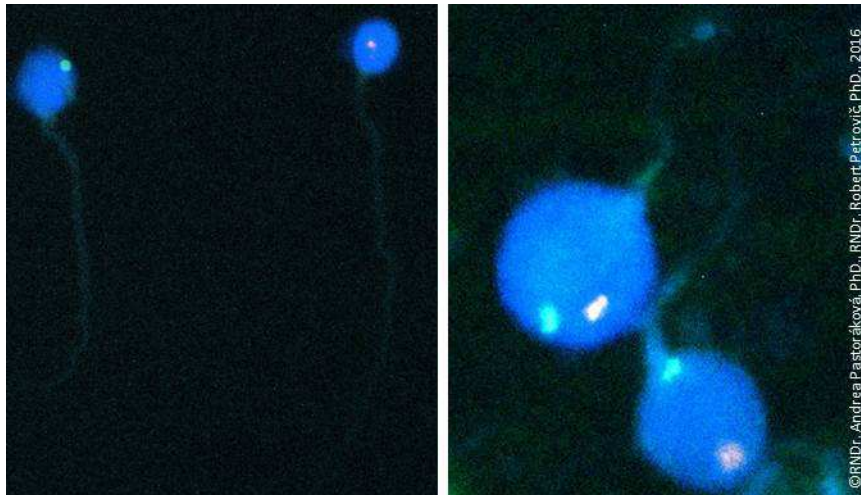
Obr. 37. Interfázna FISH, preimplantačný genetický skríning aneuploidíí – blastoméra 3-denného ľudského embrya s normálnym počtom chromozómov 13, 18, 21, pohlavie XY, použitých 5 sond pre chromozómy 13 – orange, 18 – aqua, 21 – green, X – blue a Y – yellow (poskytnuté RNDr. Ivetou Černákovou, PhD., Reprogen)



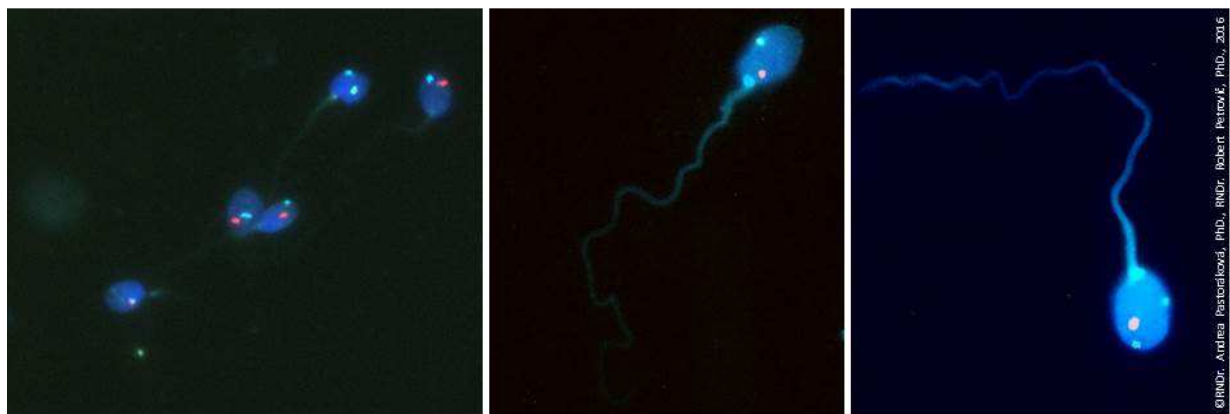
Obr. 38. Interfázne jadro po hybridizácii s centromérovou sondou pre chromozóm 8 (Vysis, Abbott). V pravom jadre je prítomná trizómia chromozómu 8 (poskytnuté RNDr. Andreou Blahovou, Medirex)



Obr. 39. Metafázna (A) a interfázna FISH (B), použitá centromérová sonda CEPX spectrum orange/CEPY spectrum green (Vysis, Abbott). Sonda hybridizuje k centromérovej oblasti chromozómov X (červený signál) a Y (zelený signál) (poskytnuté RNDr. Andreou Blahovou, Medirex)



Obr. 40. Interfázna FISH, vyšetrenie spermií, použité sondy CEPX green/CEPY orange (Aneuscore Metasystems). SONDY hybridizujú k centromérovej oblasti chromozómov X (zelený signál), Y (červený signál); vľavo – dve haploidné spermie (majúce jedna spermia X, druhá Y chromozóm), vpravo – dve patologické spermie obsahujúce gonozómový komplement XY (poskytnuté RNDr. Ivetou Černákovou, PhD., Reprogen)

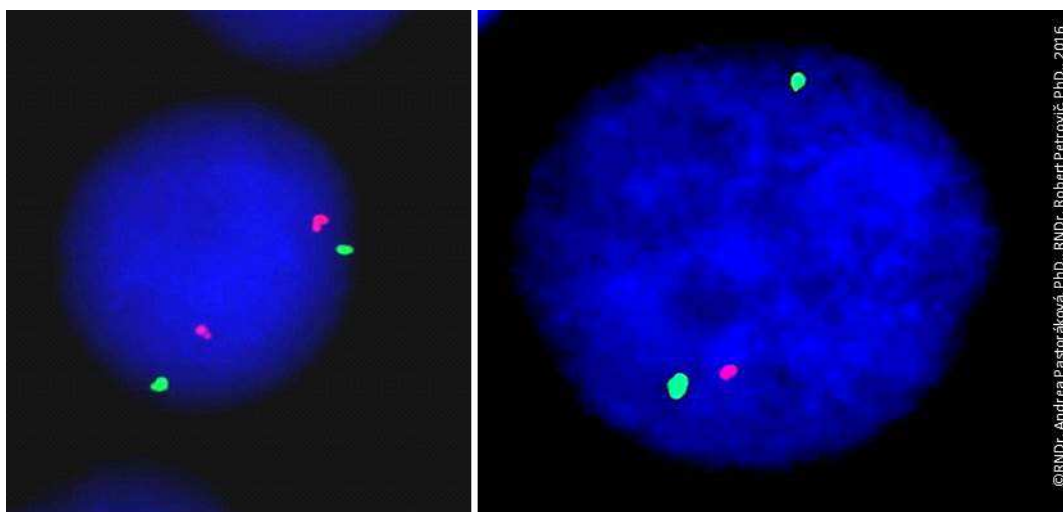


Obr. 41. Interfázna FISH, vyšetrenie spermií, použité sondy CEPX green/CEPY orange a CEP18 aqua (Aneuscore Metasystems). SONDY hybridizujú k centromérovej oblasti chromozómov X (zelený signál), Y (červený signál) a 18 (modrý signál); vľavo – normálne haploidné ľudské spermie - 1x chromozóm X alebo Y a jedenkrát chromozóm 18; v strede – patologická spermia obsahujúca gonozómový komplement XY a jeden chromozóm 18, vpravo – patologická diploidná spermia s chromozómami X, Y a dvoma chromozómami 18 (poskytnuté RNDr. Ivetou Černákovou, PhD., Reprogen).

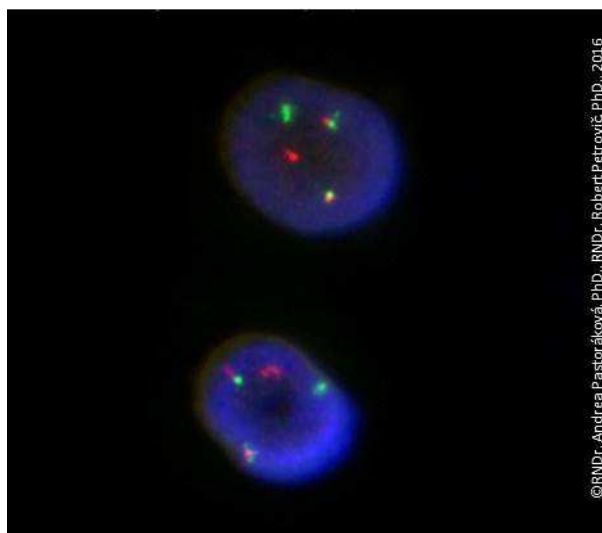
- **lokusovo špecifické sondy** – hybridizácia prebehne na konkrétnom mieste génu (lokuse) (obr. 42-44), používajú sa k vyšetreniu mikrodélií (straty malých častí chromozómu pri mikrodelených syndrómoch), k zisteniu amplifikácie onkogénov a niektorých špecifických translokácií, prestavby génov, umožňujú interfáznu FISH na nedeliacich sa bunkách;
- **subtelomerové** – väzba na koncové časti chromozómu – teloméry;
- **celochromozómové** alebo celomaľovacie sondy – sondy hybridizujú s mnohopočetnými chromozómovými sekvenciami, pričom sa fluorescenčne tak „vymaľuje“ celý chromozóm (Obr. 45). Používajú sa na vyšetrenie chromozómových prestavieb, k analýze translokácií a k detekcii pôvodu tzv. marker chromozómov (malých nadpočetných chromozómov neznámeho pôvodu). K použitiu sondy sú potrebné metafázne chromozómy, nepoužívajú sa pre interfáznu FISH.

Pri konvenčnej chromozómovej FISH sú homogénne DNA próby hybridizované s fixovaným metafáznym alebo prometafáznym chromozómom/chromozómami na sklíčku (Obr. 36a). Maximálna rozlišovacia schopnosť **metafáznej FISH** je niekoľko megabáz (Obr. 39a, 45), využitím viac

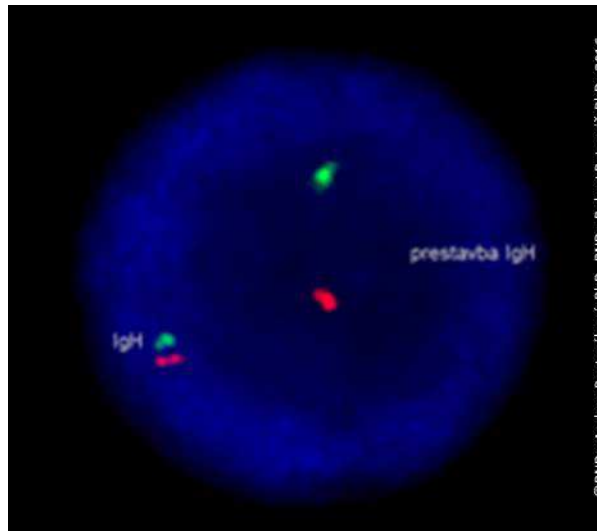
natahnutých prometafáznych chromozómov sa dosiahne 1 Mb rozlíšenie. Prostredníctvom **fiber FISH**, konkrétne artificioálne deproteinizovanej natahnutej DNA pripravenej *in situ* z celých buniek na mikroskopickom sklíčku, je možné vizualizovať individuálne gény, malé DNA elementy na chromozóme s rozlíšením okolo 1000 bp.



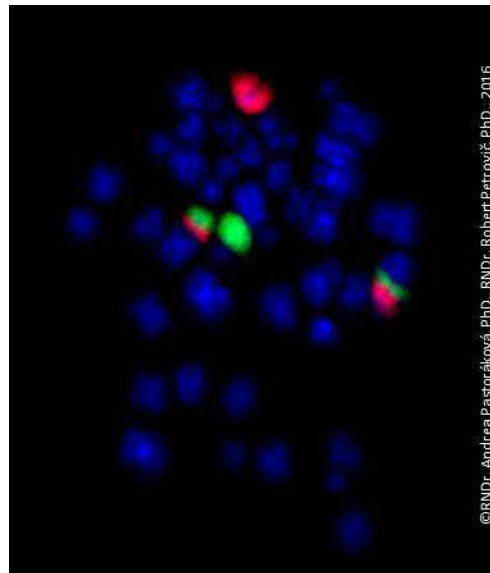
Obr. 42. Interfázne jadro po hybridizácii s lokusovo-špecifickou sondou LSI 5q31 Spectrum Orange/5p12 Spectrum Green (Vysis, Abbott). Na ľavom obrázku sú prítomné dva červené (5q31) a dva zelené signály (5p12), v pravom jadre je prítomná delécia 5q31 oblasti, chýba jeden červený signal (poskytnuté RNDr. Andreou Blahovou, Medirex)



Obr. 43. Interfázna FISH, použitá lokusovo-špecifická sonda – translokačná - XL BCR/ABL1 plus (Metasystems), dvojfarebná dvojfúzna, kde červená označuje lokus ABL1 na chromozóme 9 a zelená oblasť BCR na chromozóme 22. Sonda deteguje fúziu protoonkogénu *ABL1* (9q34) a génu *BCR* (22q11) v prípade, že červený a zelený signál sú pri sebe (poskytnuté RNDr. Andreou Blahovou, Medirex)



Obr. 44. Interfázna FISH, Použitá lokusovo-špecifická sonda- typ "break apart" pre *IGH* gén. V dôsledku translokácie došlo k rozskočeniu génu, pričom translokačného partnera nepoznáme, vieme určiť len percento v koľkých jadrách je gén prestavaný (poskytnuté RNDr. Andreou Blahovou, Medirex)

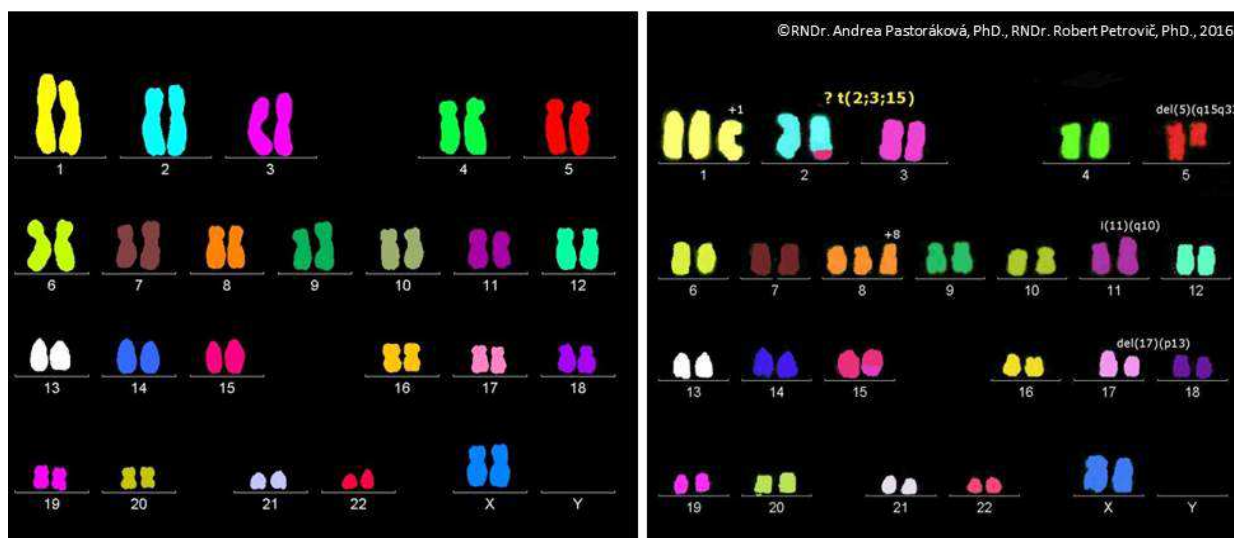


Obr. 45. Použité celochromozómové sondy WCP 15 (červený chromozóm) a WCP 17 (zelený chromozóm). Na metafáze je potvrdená recipročná translokácia $t(15;17)(q22;21)$ (poskytnuté RNDr. Andreou Blahovou, Medirex)

FISH vizualizácia celého chromozómu, **maľovanie chromozómu** anglicky **chromosome painting**, je špeciálnou aplikáciou chromozómovej FISH, próba je koktail veľkého počtu rôznych fluorescenčne značených DNA fragmentov hybridizujúcich pozdĺž celého konkrétneho chromozómu (obr. 36b, 45). „Chromosomepainting“ analyzuje metafázne chromozómy. V minulosti bola FISH vizualizácia celých chromozómov limitovaná malým množstvom rôzne sfarbených fluorochrómov.

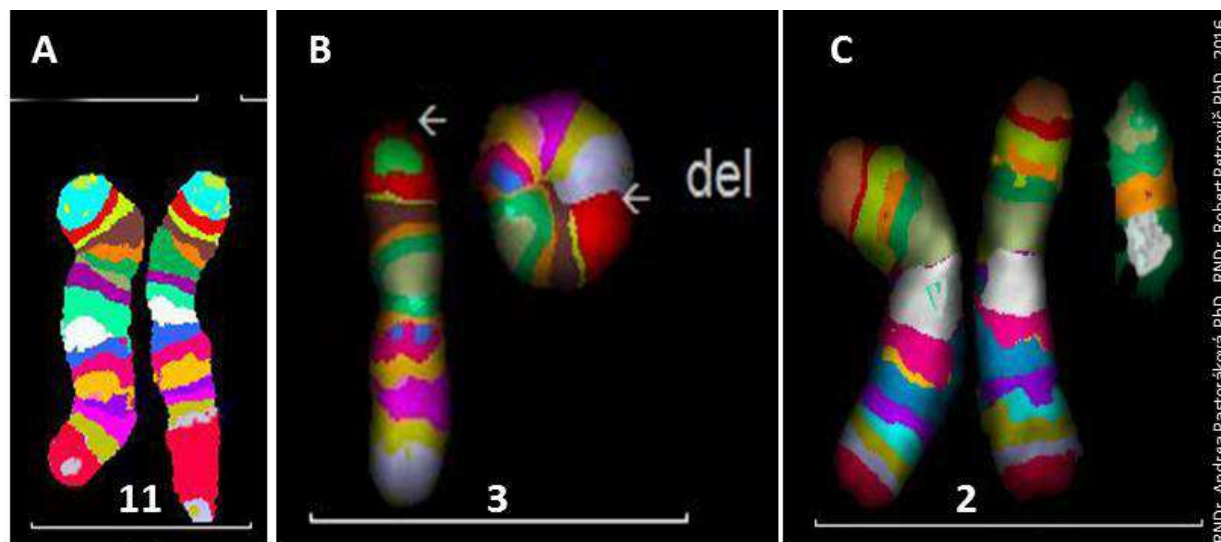
V súčasnosti je možné detegovať množstvo cieľových sekvencií naraz, čo sa využíva pri celogenómovej chromozómovej vizualizácii (whole-chromosomepainting - WCP) metódou **multiplex FISH (M-FISH, multicolor FISH, obr. 46)** alebo **spektrálnej karyotypizácie (SKY)**, kedy možno rozlíšiť všetky ľudské chromozómy – teda 24 rôznych chromozómov. M-FISH a SKY patria medzi metafázne formy FISH diagnostiky, ktoré umožňujú simultánnu vizualizáciu všetkých ľudských chromozómov v rôznych farbách, čo predstavuje uľahčenie analýzy karyotypu, hlavne pri komplexných zmenách a markeroch neznámeho pôvodu. Obe techniky vychádzajú z použitia

celochromozómových sond značených kombináciou viacerých fluorochrómov. Rozdiel medzi M-FISH a SKY spočíva v technike získania konečného obrazu.



Obr. 46. Multicolor FISH - každý chromozómový pár je zafarbený inou farbou, pričom na ich zafarbenie postačuje kombinácia 5 fluorochrómov. Na vyhodnocovanie je potrebná špeciálna sada fluorescenčných filtrov pre jednotlivé fluorochrómy a špeciálny softvér. Vľavo-štandardný karyotyp, vpravo karyotyp s mutáciami (poskytnuté RNDr. Andreou Blahovou, Medirex)

V molekulovej cytogenetike sú komerčne dostupné sety M-FISH prôb umožňujúce viacfarebné prúžkovanie chromozómov (banding) s vysokým rozlíšením (multicolor-banding, **mBAND FISH**, MCB), čo umožňuje identifikáciu intrachromozómových prestavieb (Obr. 47). Nevyhnutnosťou mBAND-u je mať chromozómy v metafáze. Táto metóda bola prvýkrát uskutočnená na chromozóme 5 v roku 1999. mBAND FISH umožňuje rozlíšiť špecifické oblasti chromozómov na úrovni prúžku - bandu a sub-bandu, s detekciou 550 bandov haploidného karyotypu.



Obr. 47. **A** - mBAND chromozómu 11 - inverzia duplikovanej oblasti 11q22.3-q25; **B** - mBAND chromozómu 3 - na kruhovom chromozóme delícia oblasti 3p26.3; **C** - mBAND chromozómu 2 - potvrdenie inverzie duplikovanej časti chromozómu (poskytnuté RNDr. Dagmar Landlovou, Medirex)

FISH metóda a jej varianty (M-FISH, mBAND, SKY) majú v súčasnosti široké využitie v klinickej genetike: v onkologickej genetike na detekciu aberácií v čase diagnózy, počas liečby, po

liečbe, monitorovanie po transplantácii kostnej drene, v prenatalnej a postnatalnej diagnostike pri detekcii submikroskopických delécií (napr. DiGeorge syndróm - 22q11.2 delečný syndróm, Prader-Willi syndróm- chromozóm 15q11-13), prostredníctvom FISH je možná detekcia numerických zmien chromozómov (trizómia chromozómu 21 pri Downovom syndróme, trizómia chromozómu 15 pri Patauovom syndróme, trizómia chromozómu 18 pri Edwardsovom syndróme), rôzne zmeny v počte pohlavných chromozómov (monozómia X pri Turnerovom syndróme, Klinefelterov syndróm s X chromozómom navyše - XXY), podobne v predimplantačnej diagnostike.

8.3 DNA Microarray (DNA mikročip, biočip)

DNA mikročipovanie je technika využívajúca hybridizáciu skúmanej nukleovej kyseliny (cieľová vzorka) s veľkým množstvom oligonukleotidových prôb (desať tisíc až milión), ktoré sú prichytené na pevný podklad najčastejšie sklený, silikónový alebo nylonový (doštička, čip). Skúmaná nukleová kyselina je pred hybridizáciou fragmentovaná, označená fluorofórom a denaturovaná. Po kontakte čipu s cieľovou vzorkou, ktorá je vlastne zmes označených oligonukleotidov, značené oligonukleotidy hybridizujú s oligonukleotidovými sekvenciami prichytenými na čipe. Potom sú na základe fluorescence detekované miesta, kde došlo k hybridizácii, čiže vzorka obsahovala takúto nukleotidovú sekvenciu. Z jedného mikročipu sa získa obrovské množstvo dát, ktoré je vždy nutné softvérovo spracovať. V dnešnej dobe existuje niekoľko firiem poskytujúcich komerčne mikročipy na objednávku, alebo si ich laboratória produkujú sami.

Mikročipovanie prebieha nasledovne:

- 1) Vytvorenie DNA čipu** – tisíce rôznych jednovláknových DNA oligonukleotidov známych sekvencií sa kovalentne naviažu na povrch doštičky, vždy v určitej lokalite je niekoľko rovnakých oligonukleotidov, veľkosť takejto lokality je <200 µm. Prôbami môže byť DNA, cDNA alebo syntetizované oligonukleotidy. Už hotové mikročipy ponúkajú viaceré firmy (Affymetrix, Agilent Technologies, Eppendorf, Illumina) alebo si ich jednotlivé laboratória vyrábajú sami pomocou robotických zariadení. DNA čip sa vytvára buď **nanášaním kvapiek oligonukleotidov** na podklad alebo **syntézou oligonukleotidov in situ** na čipe;
- 2) Príprava vzorky** – nukleová kyselina (mRNA, DNA) sa purifikuje, určí sa jej kvantita a kvalita (spektrofotometericky), fragmentuje, resp. v prípade mRNA sa syntetizuje cDNA, v prípade potreby sa môže DNA amplifikovať PCR reakciou, štiepiť restriktívnymi endonukleázami;
- 3) Fluorescenčné označenie** (zriedkavejšie rádioaktívne) fragmentov DNA prebieha počas reverznej transkripcie alebo PCR amplifikácie za účasti fluorescenčne značených nukleotidov. Keď sa analyzujú dve rôzne vzorky napr. zdravé tkanivo a nádorové tkanivo, označenie nukleových kyselín v týchto tkanivách býva rozdielne, a to použitím dvoch rôznych fluorescenčných farbív (napr. zelené a červené). Pred hybridizáciou je potrebné vzorku denaturovať, čím sa vytvorí zmes jednovláknových DNA označených značkou;
- 4) Hybridizácia s mikročipom** – v špeciálnom hybridizačnom roztoku hybridizujú komplementárne sekvencie zo vzorky s príslušnými oligonukleotidovými sondami naviazanými na čipe. Potom sa čip obmyje, aby došlo k odstráneniu čiastočne hybridizovaných nukleových kyselín;
- 5) Skenovanie mikročipu** – skenerom čipov dôjde k ožiareniu čipu laserom, pričom v mieste hybridizácie fluorescenčne značených DNA fragmentov s próbou dôjde k emisii svetla určitej vlnovej dĺžky, ktorú skener zaznamená;
- 6) Analýza dát** prebieha metódami bioinformatiky, spracovaním softvéromi sa zistí, ktoré lokality čipu navzájom hybridizovali, v prípade použitia dvoch vzoriek kontrolnej a skúmanej je možné analyzovať ich relatívnu intenzitu hybridizácie (expresie určitého génu).

Existujú štyri typy mikročipov:

- 1) Čipy určené na analýzu expsie** (obsahujú cDNA próby), pre tzv. dvojkanálový experiment, kedy je vzorka určená k hybridizácii na čipe získaná zmiešaním DNA fragmentov kontrolnej a skúmanej vzorky, pričom fragmenty sú rozdielne fluorescenčne označené (napr. zelený fluorofór pre kontrolnú vzorku a červený pre skúmanú). Na základe intenzity a typu fluorescence sa deteguje expresia génov typická pre kontrolnú vzorku (napr. zelená fluorescencia), pre skúmanú vzorku (napr.

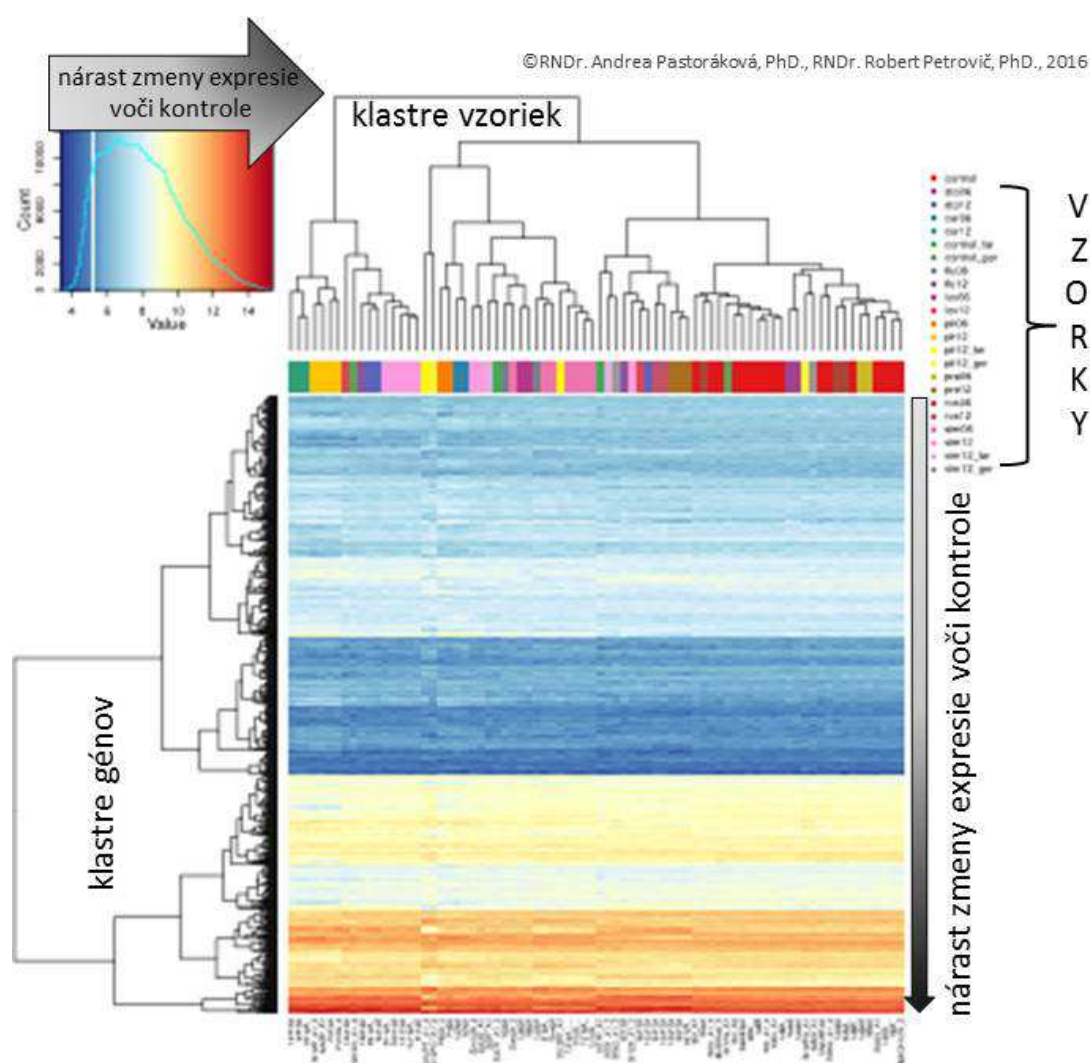
červená fluorescencia) a expresia podobná u oboch vzoriek (žltá fluorescencia), neexprimované gény (čierna fluorescencia), rôzne odtiene (v závislosti od prevažujúcej hybridizácie) (obr 48);

2) Čipy určené na analýzu mutácií, použije sa genómová DNA označená jednou fluorescenčnou farbičkou na určenie jednonukleotidovej zmeny (SNP – Single Nukleotide Polymorphism);

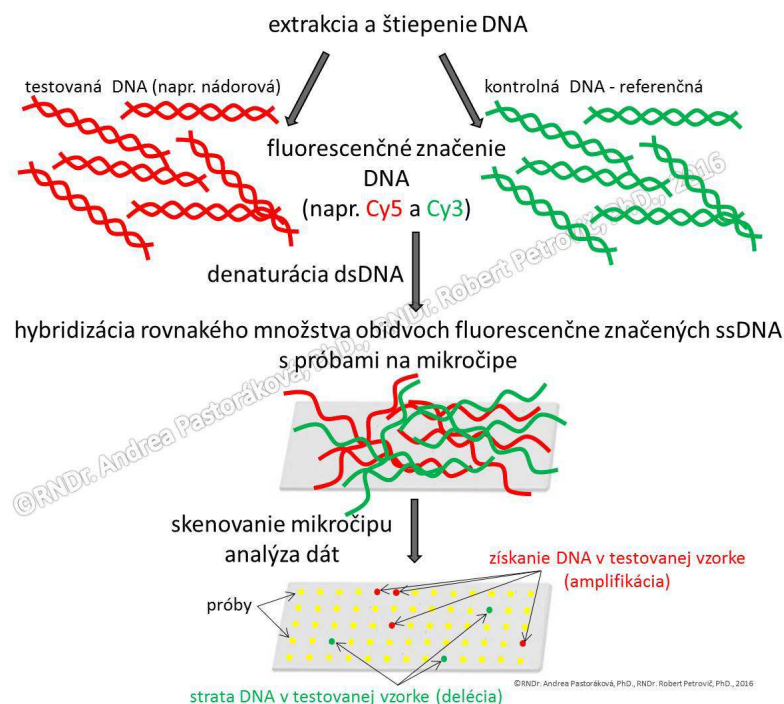
3) Čipy na komparatívnu genómovú hybridizáciu (aCGH, array Comparative Genomic Hybridization) – používané na zistenie zvýšenia alebo zníženia množstva chromozómových fragmentov obsahujúcich gény zodpovedné za určité ochorenie. Na analýzu sa použije skúmaná gDNA a referenčná (kontrolná) DNA, každá sa značí inou fluorescenčnou farbičkou (princíp ako pri analýze expresie) (obr. 49, 50);

4) Čipy CGH - SNP, kombinované čipy určené na analýzu aj mutácií SNP aj na komparatívnu genómovú hybridizáciu CGH.

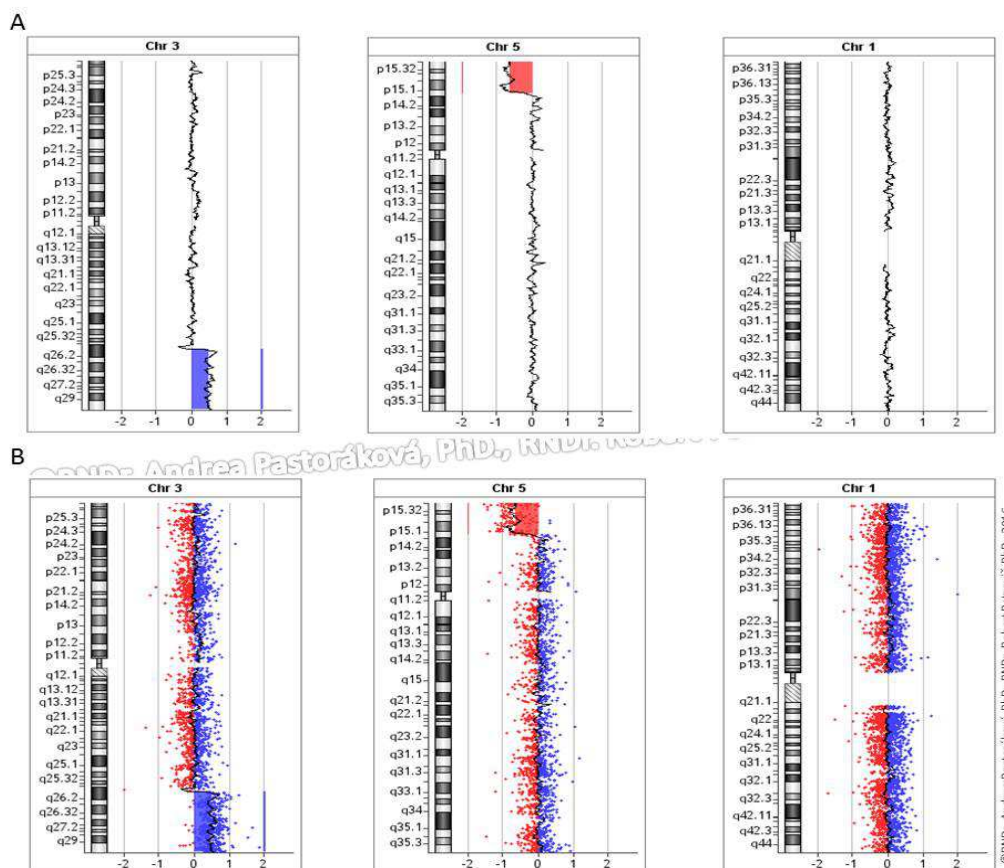
Mikročipy majú rozsiahle využitie napríklad v identifikácii nových génov, vo výskume ich funkcií, expresie v rôznych podmienkach, pri diagnostike mnohých ochorení, vo farmakogenomike, vo výskume vplyvu toxínov.



Obr. 48. Heatmapa génovej expresie vybraných génov (mRNA), mikročip obsahuje 46000 cDNA prób (poskytnuté Ing. Helenou Gbelcovou, PhD., Ústav lekárskej biológie, genetiky a klinickej genetiky LF UK a UNB)



Obr. 49. Princíp komparatívnej genómovej hybridizácie (aCGH - array comparative genomic hybridization)



Obr. 50. A) Výsledok komparatívnej genómovej hybridizácie (aCGH - array comparative genomic hybridization) vzorky DNA izolovanej plodovej vody. U plodu s abnormálnym ultrasonografickým vyšetrením bola identifikovaná duplikácia oblasti 3q26.1q29 (modrý pás) a delécia oblasti 5p15.33p15.1 (červený pás). Pre porovnanie chromozóm 1 bez aberácie. b) Ten istý pacient ale iné softvérové spracovanie. (poskytnuté RNDr. Miroslavom Tomkom, PhD., Medirex)

Odporúčaná a použitá literatúra

Odborné knihy

Klug W. S., Cummings M. R., Spencer Ch. A., Palladino M. A.: Concepts of Genetics, jedenáste vydanie (2015)

Carson S.: Molecular Biology Techniques, tretie vydanie (2012)

Strachan T., Read A: Human Molecular Genetics, štvrté vydanie (2011)

Sudbery P., Sudbery I.: Human Molecular Genetics, tretie vydanie (2009)

Internetové stránky

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.mlpa.com

www.thermofisher.com

www.illumina.com

www.promega.sk

www.qiagen.com

www.ambion.com

Odborné články

Chacon-Cortes D., Griffiths L. R.: Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives, Journal of Biorepository Science for Applied Medicine, Volume 2, strany: 1- 9

Viltrop T, Krjutskov K, Palta P, Metspalu A.: Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction, Anal Biochem. 2010 Volume 398(2), strany: 260-262

Ing. Martin Čermák: Molekulárna cytogenetika v problematike familiárnych malignít, Onkológia , Volume 2, strany: 77 - 83

Livak K.J., Schmittgen T.D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, Methods_ 2001, Volume 25(4), strany: 402 - 408

Bustin S. A.: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000, Volume 25(2), strany: 169 - 193

MOLEKULÁRNE METÓDY AKTUÁLNE POUŽÍVANÉ V KLINICKEJ GENETIKE

RNDr. Andrea Pastoráková, PhD., RNDr. Robert Petrovič, PhD.

Vydala Univerzita Komenského v Bratislave, Lekárska fakulta

Rozsah 50 strán, 2,46 AH, prvé vydanie.

ISBN 978-80-223-4231-5