



EVROPSKÁ UNIE  
Evropské strukturální a investiční fondy  
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



Zpráva o řešení projektu reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16\_015/0002362

# Metody studia DNA a RNA I

Mgr. Petr Daniel

[petr.daniel@lf3.cuni.cz](mailto:petr.daniel@lf3.cuni.cz)

# Praktika

**Navazují na přednášku.**

**Vedoucí praktika:** Mgr. Petr Daniel

**Asistenti:** Mgr. Pavla Elčnerová  
RNDr. Jan Šrámek, Phd.  
RNDr. Michal Šíma, PhD.  
Simona Šolcová



# Praktika

- ⦿ Udělení zápočtu (přítomnost a test)
- ⦿ **Laboratorní plášť s sebou!**
- ⦿ **Nepoužívat mobilní telefony!**
- ⦿ **Nedotýkat se vybavení bez rukavic!**
- ⦿ Příklad 15 minut po začátku praktika - nebudete vpuštěni na praktikum!
- ⦿ Nepřítomnost/změna praktika (ideálně max. den předem): petr.daniel@lf3.cuni.cz
  - jednotlivec
  - celý kruh



# Zdroje nukleových kyselin

**DNA určitého genu**

**– všechny jaderné buňky**

**RNA určitého genu**

**- jenom ty buňky,  
kde se daný gen exprimuje**

# Proč se používá DNA diagnostika

- ⦿ Vysoká citlivost
- ⦿ Přesnost
- ⦿ Rychlost
- ⦿ Nízká cena (přístroje, chemikálie)
- ⦿ Kvantita
- ⦿ Automatizace

# DNA polymorfizmus

- ⊙ Variabilita sekvence DNA mezi rozdílnými jedinci téhož druhu.
- ⊙  $2,5 \times 10^6$  (1 nt každých 1300 nt)
- ⊙ Typy polymorfismů:

**SNP** (snips) – single nucleotide polymorphism  
- záměna 1 nt za jiný

**Inzerce/Delece**(Indels)



# DNA polymorfismus a mutace

## ● Alelový polymorfismus

fyziologická funkce, s frekvencí  $> 1\%$   
predispozice k polygenním chorobám

## ● Mutace

patologická funkce, s frekvencí  $< 1\%$  (selekce)  
příčina monogenních chorob  
vznik spontánně v buňkách germinální linie  
jednoho z rodičů (např. monogenní autismus –  
mutace v jednom z mnoha stovek genů)

# Charakteristika DNA diagnostiky

**Detekce určitého polymorfizmu daného predispozičního genu**

- ◎ CÍLENÉ ANALÝZY
- ◎ KOMPLETNÍ ANALÝZY

# Cílené analýzy

- ⦿ **Lokalizace a celá sekvence genu je známá**
- ⦿ **Mutace genu je známá**

Vyšetření členů rodiny není nutné

Metody - **RFLP, Hybridizace, Sekvenování**

# Kompletní analýzy

- ⦿ Lokalizace a celá sekvence genu je známá
- ⦿ Mutace genu jsou neznámé

Vyšetření členů rodiny je nezbytné

Metody - sekvenování

# Co se detekuje ?

- Monogenní a polygenní dědičné choroby
- Některé typy nádorů
- Přítomnost infekce (detekce patogenů)
- Progrese choroby během léčby
- Identifikace osob ve forenzní medicíně
- HLA -typizace v případě transplantace
- ...
- Prevence = vyšetření:
  - preimplantační
  - prenatalní
  - presymptomatické

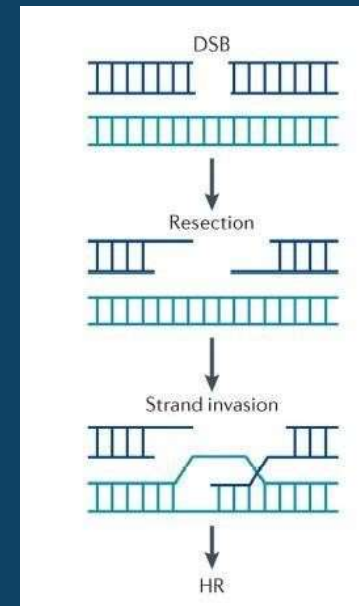
# Hereditární karcinom prsu a ovária (HBOC)

- 50-80% riziko vzniku nádoru prsu a 30-50% riziko vzniku nádoru ovária
- 5-10% všech nádorů prsu
- Nejčastěji asociován s mutacemi v BRCA1 a BRCA2
  - Méně zastoupené CHK2, ATM, BRIP, PALB2
- Autosomálně dominantní (mutace 1 alely)
- Účastní se homologní rekombinace (HR) dvouvláknových zlomů

## Dvouvláknové DNA zlomy

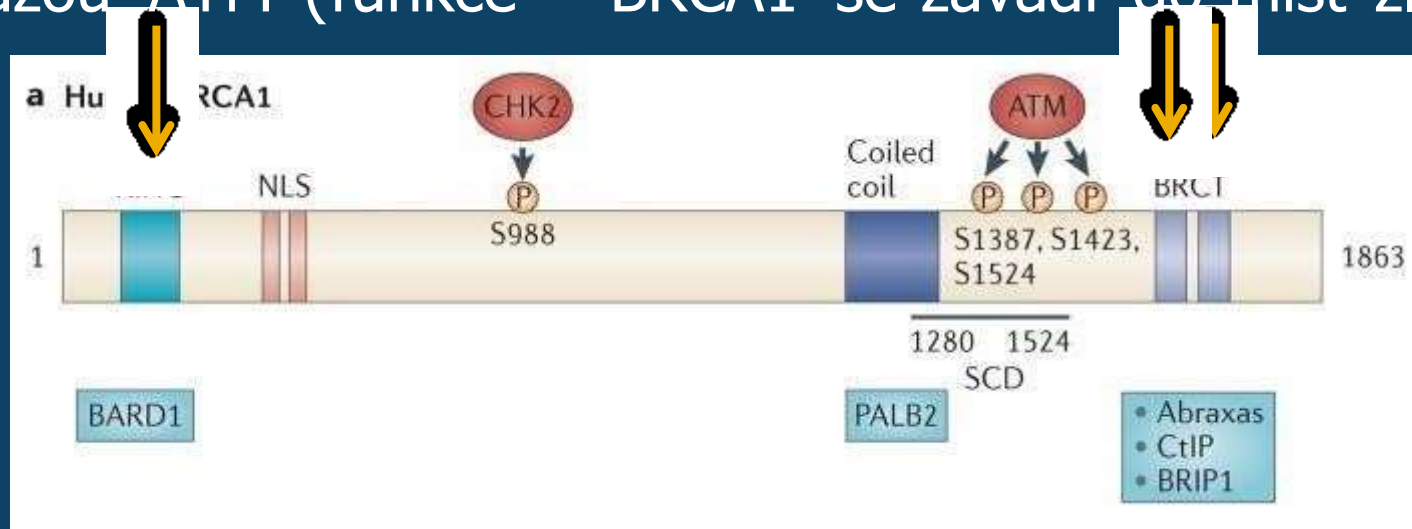
NHEJ (nehomologní spojování volných konců)  chyby

HR (homologní rekombinace)  bez chyb



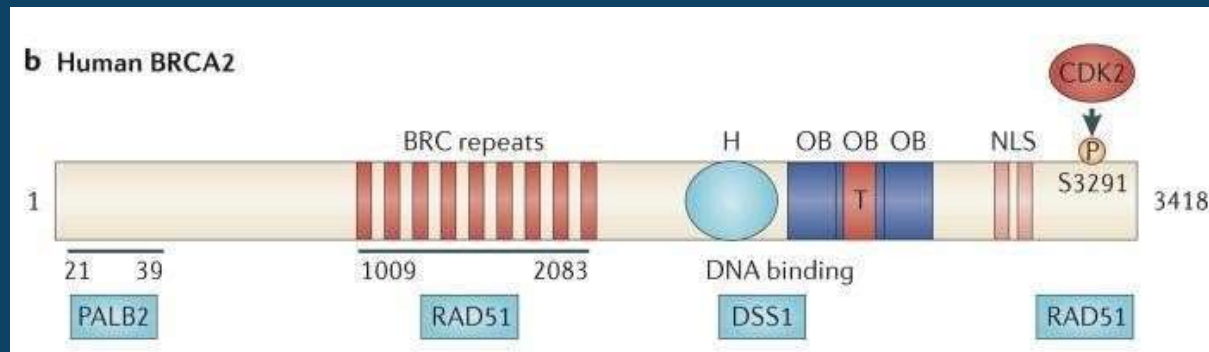
# Funkce BRCA1

- BRCA1 – HR, NHEJ, SSA, checkpoint regulace (reg. bun. cyklu)
- Mutace HBOC v doménách RING nebo BRCT
- **E3 ubikvitin ligáza** (doména RING) např. ubikvitinace proteinu CtIP – vazba na komplex MRN a podporuje jeho aktivitu k HR)
- BRCT doména – vazba proteinů fosforylovaných kinázou ATM (funkce – BRCA1 se zavádí do míst zlomů)



# Funkce BRCA2

- Funkce v HR
- Rekrutuje protein Rad51 do míst zlomů (po resekci)



- BRCA1 1/800 (BRCA1 a BRCA2 1/500)

- Česká republika:

BRCA1: **c.181T>G**, **c.5266dupC**, c.3700\_3704del5

BRCA2: c.7913\_7917del5 c.8537\_8538del2

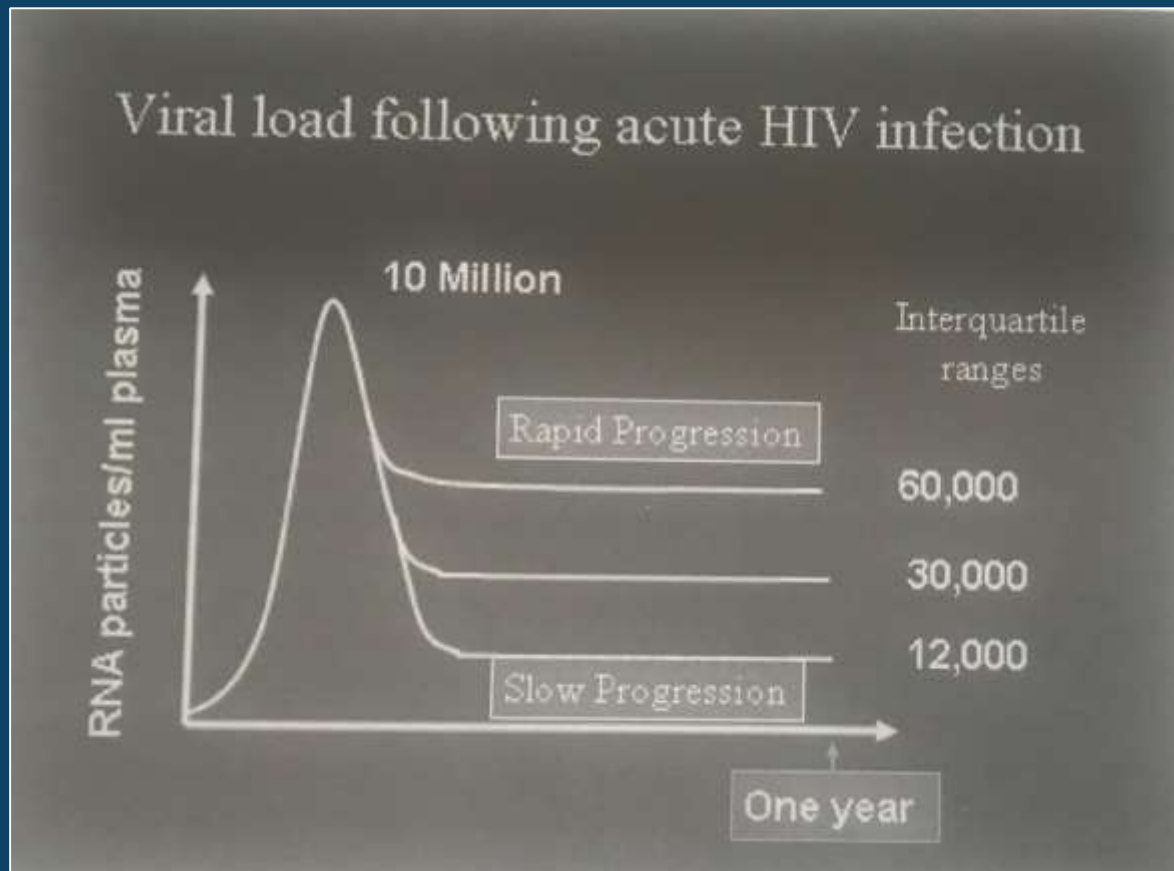


# Přítomnost infekce (viry)

- ⊙ DNA/RNA analýza se používá v případech:
  - > Nelze potvrdit infekci metodou Western blot
  - > **Kongenitální infekce (CMV)**
  - > **Přítomnost viru v cerebrospinální tekutině (CSF) – meningitidy (Measles, Rabies)**
  - > Nelze určit typ viru (např. HSV1 vs HSV2)
  - > Respirační onemocnění (SARS)
  - > Enteroviry
  - > Detekce zoonóz

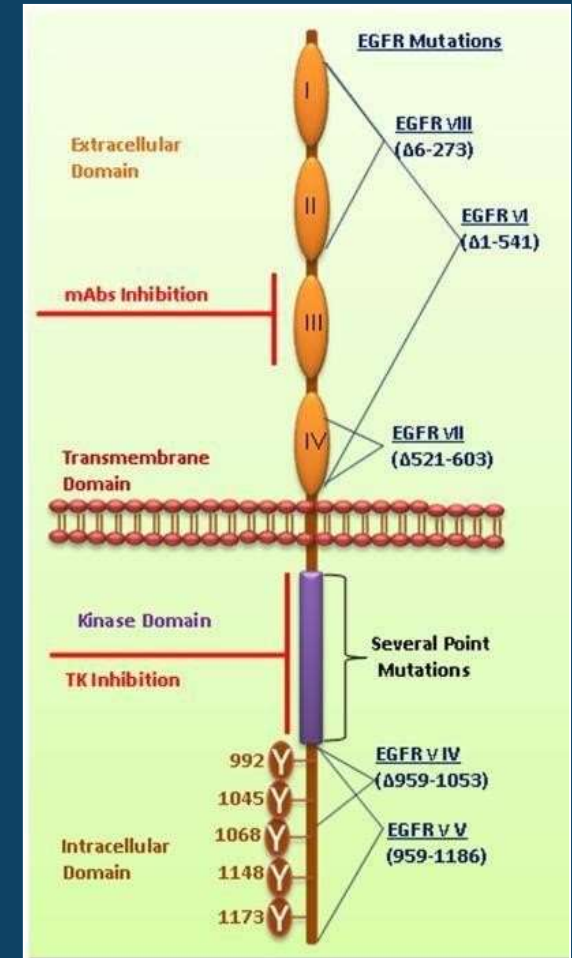
# Progrese choroby během léčby - HIV

- RNA viry – RT-PCR, DNA viry - PCR
- **RT-PCR** – stanovení HIV RNA v plazmě (virová nálož)



# Typy nádorů – cílená léčba

- Př. **Nemalobuněčný karcinom plic** (NSCLC, non-small cell lung cancer) – nejčastější nádor plic (80%)
- Asi 60% NSCLC nádorů exprimuje EGFR (asi 15% obsahuje aktivující mutace)
- **Osimertinib** (Tagrisso)
  - > inhibitor EGFR 3. gen (T790M)
  - > substituce threoninu za methionin rezistence C797S



# Metody DNA diagnostiky

- ⊙ RFLP → Gelová elektroforéza → Southern blot
- ⊙ PCR → RFLP → Gelová elektroforéza (praktika)
- ⊙ PCR → Gelová elektroforéza (praktika)
- ⊙ PCR → Sekvenace

# Restrikční endonukleázy

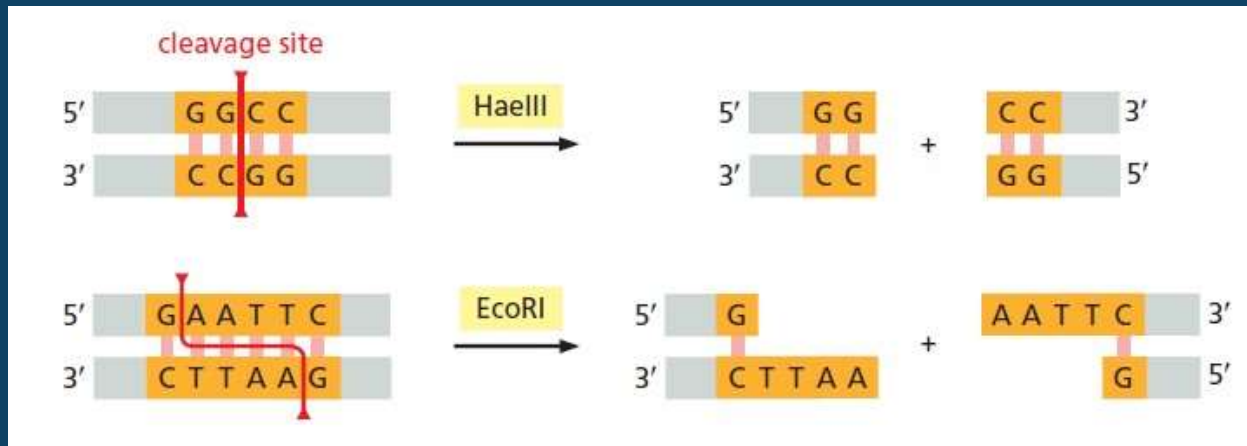
- Štěpí fosfodiesterovou vazbu v definované sekvenci, tzv. **restrikční místo** „uvnitř“ DNA
- Izolovány z mikroorganismů (restrikčně -modifikační systém), cca 1970
- RE II typu – štěpí definovanou sekvenci, často palindrom (4-8nt)
- Nevyžadují energii ATP
- Homodimer
- Názvosloví:
  - EcoRI* (*Escherichia coli R I*)
  - BamHI* (*Bacillus amyloliquefaciens H I*)
- Využití: klonování, RFLP

- ⊙ Vznik produktů s různými typy konců:

**Lepivé** (kohezní, přesahující) **konce**

3' přesahující, 5' přesahující

**Tupé** konce



- ⊙ Fragmenty lze spojit pomocí DNA ligázy (např. T4 DNA ligáza + ATP)

# RFLP

## (restriction fragment length polymorphism)

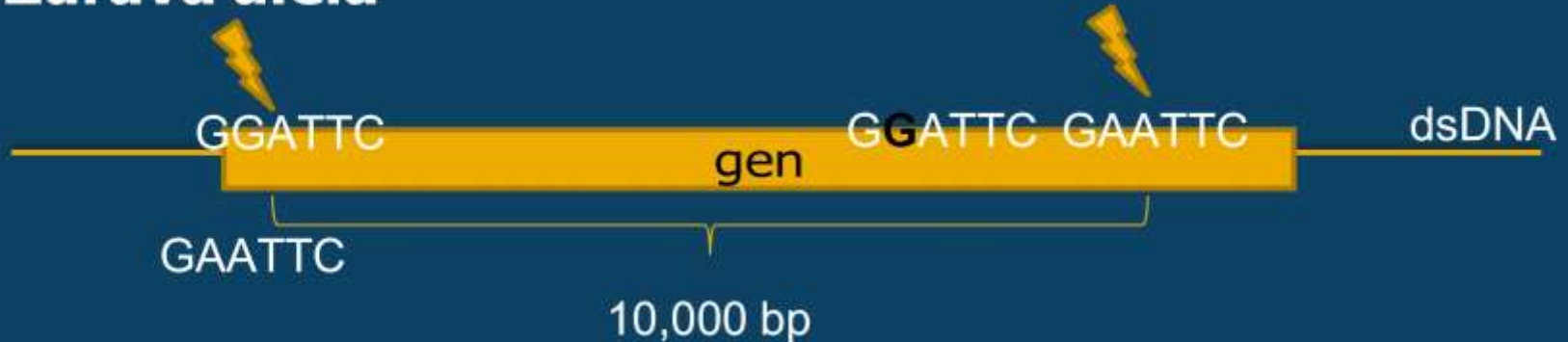
- ⊙ Některá restrikční místa jsou polymorfní
- ⊙ Např. štěpení *EcoRI* – 800,000 fragmentů
- ⊙  $N=4^n$  (N – průměrná délka fragmentu, n – počet nukleotidů)
- ⊙ 4 nt místo – 256 bp (např. GTAC)
- ⊙ 6nt místo – 4096 bp (např. GAATTC)

# RFLP

## (restriction fragment length polymorphism)

- DNA se inkubuje s tzv. **restrikční endonukleázou (RE)**

- **Zdravá alela**

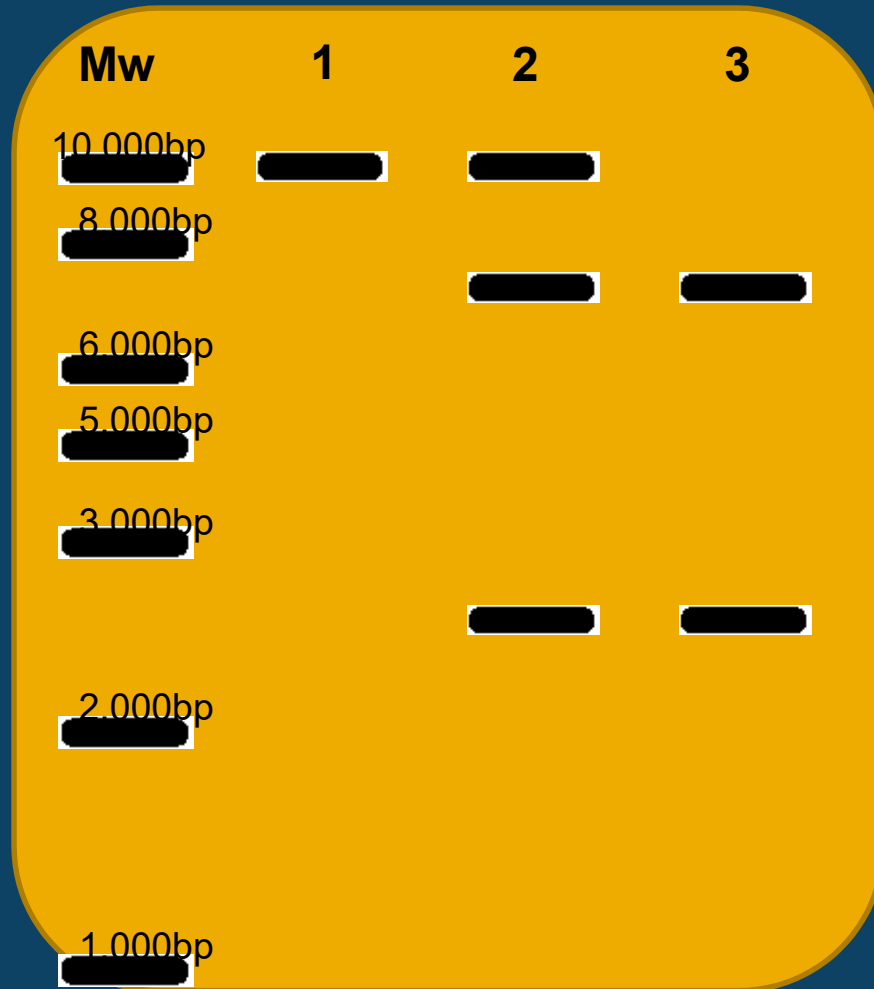


- **Mutovaná alela**

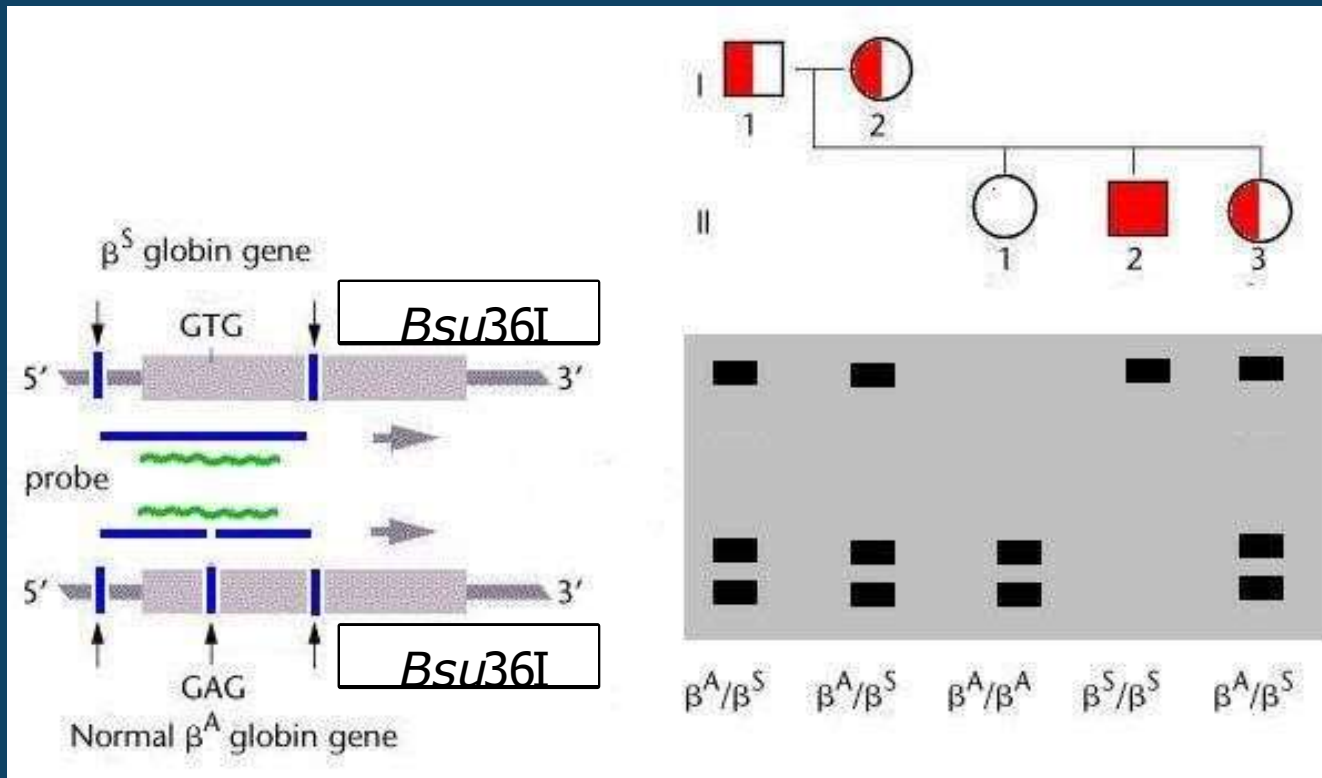




Vzorek č. 1: Homozygot(2 zdravé alely)  
Vzorek č. 2: Heterozygot  
Vzorek č. 3: Homozygot(2 mutované alely)

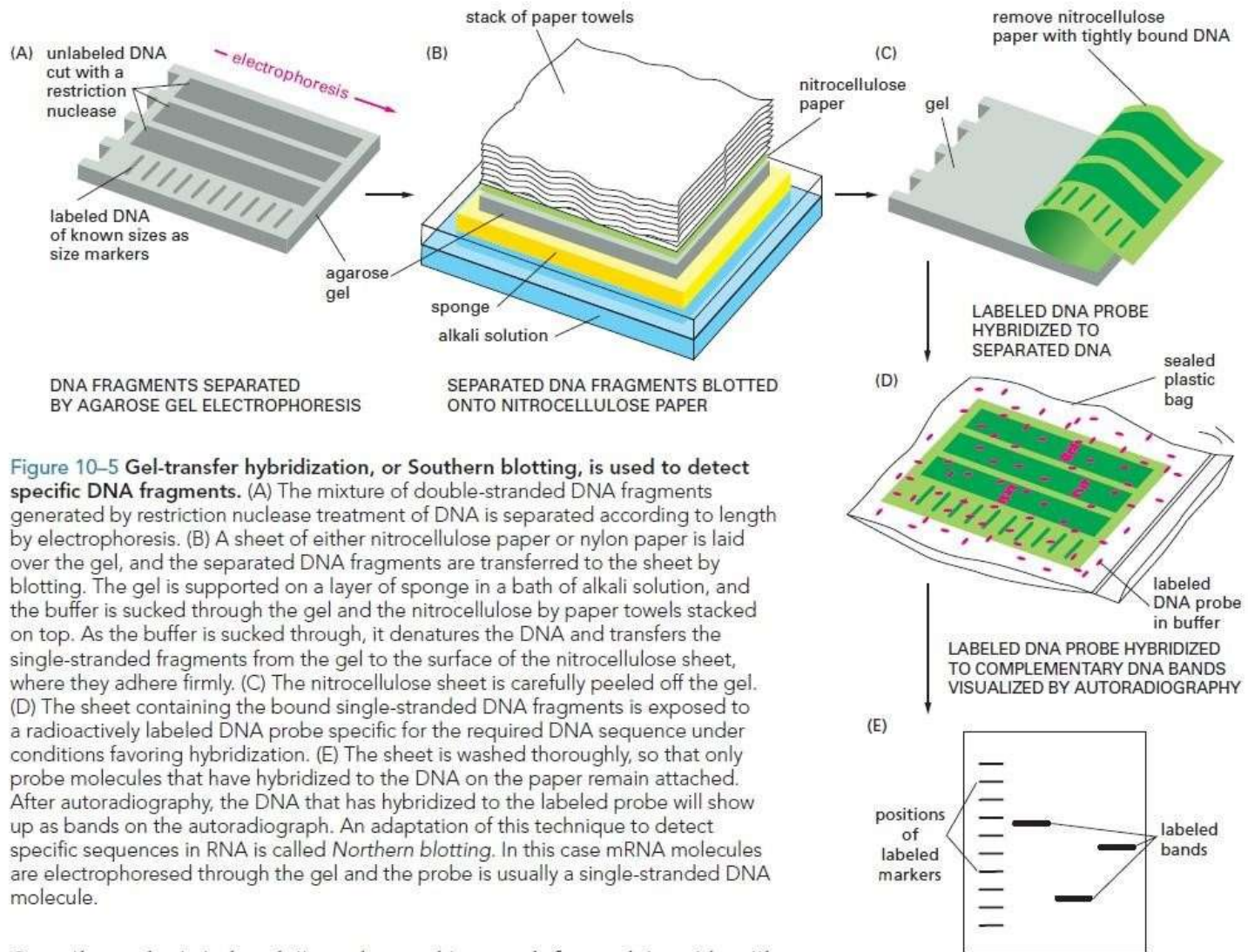


- Př. Srpkovitá anémie
- RE *Bsu36I* rozpoznává "CCTNAGG" sekvenci



[https://www.mun.ca/biology/scarr/RFLP\\_sickle-cell\\_test.html](https://www.mun.ca/biology/scarr/RFLP_sickle-cell_test.html)

# Southern blot



**Figure 10-5 Gel-transfer hybridization, or Southern blotting, is used to detect specific DNA fragments.** (A) The mixture of double-stranded DNA fragments generated by restriction nuclease treatment of DNA is separated according to length by electrophoresis. (B) A sheet of either nitrocellulose paper or nylon paper is laid over the gel, and the separated DNA fragments are transferred to the sheet by blotting. The gel is supported on a layer of sponge in a bath of alkali solution, and the buffer is sucked through the gel and the nitrocellulose by paper towels stacked on top. As the buffer is sucked through, it denatures the DNA and transfers the single-stranded fragments from the gel to the surface of the nitrocellulose sheet, where they adhere firmly. (C) The nitrocellulose sheet is carefully peeled off the gel. (D) The sheet containing the bound single-stranded DNA fragments is exposed to a radioactively labeled DNA probe specific for the required DNA sequence under conditions favoring hybridization. (E) The sheet is washed thoroughly, so that only probe molecules that have hybridized to the DNA on the paper remain attached. After autoradiography, the DNA that has hybridized to the labeled probe will show up as bands on the autoradiograph. An adaptation of this technique to detect specific sequences in RNA is called *Northern blotting*. In this case mRNA molecules are electrophoresed through the gel and the probe is usually a single-stranded DNA molecule.

Once the probe is in hand, it can be used to search for nucleic acids with

# Southern blot

- Přenos DNA fragmentů z gelu na membránu  
(800,000 fragmentů/lidská DNA štěpená RE 6nt palindrom)
- Navázání sondy (DNA značená radioaktivně/neradioaktivně)
- Detekce signálu – autoradiografie
- Nevýhoda: velké množství použité DNA

# Princip testování (PCR + RFLP)

**izolace DNA**



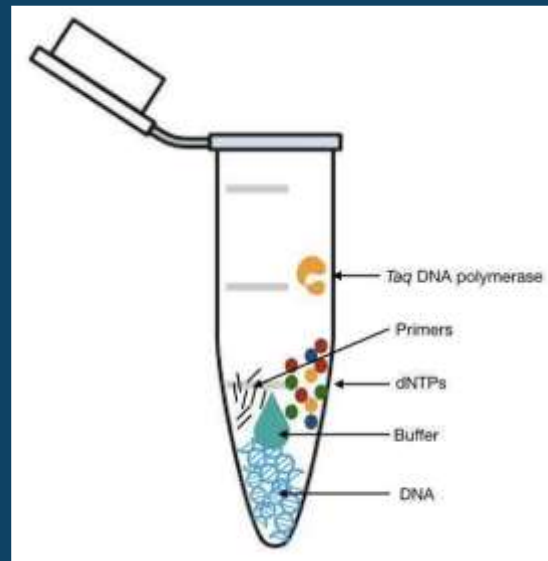
**PCR (namnožení úseku DNA)  
+ další analýzy (např. RFLP)**



**vizualizace výsledku  
(gelová elektroforéza, sekvenace)**

# Základní komponenty PCR reakce

- DNA vzorek
- Pár primerů
- Volné nukleotidy (dATP, dTTP, dCTP, dGTP )
- DNA polymeráza s pufrem



# DNA vzorek

- Kritická je kontaminace
  - Nukleázy - používání špiček bez nukleáz
    - používat a měnit rukavice
    - sterilní prostředí
    - inhibitory, chelatační činidla
- RNA (váže  $Mg^{2+}$ ) – inhibice reakce (RNáza )
- Kontaminace – spektrofotometr
- Množství závisí na typu použité DNA
  - Plasmidová DNA (1pg-10ng)
  - Genomová DNA (1ng-500 ng)

# DNA izolace

- ⊙ **Výběr metody** – kvalita a kvantita DNA
- ⊙ **Izolace DNA** – odstranění RNA, proteinů, malých organických molekul
- ⊙ **Základní kroky**
  - > **1. Lýze buněk** → uvolnění DNA do roztoku
  - > **2. Odstranění proteinů/RNA**
    - ☒ Proteáza
    - ☒ Adsorpce nebo extrakce
  - > **3. Precipitace DNA** ethanolem → odstranění nečistot
  - > **4. Rozpuštění DNA** ve vodě či v pufru



# DNA izolace

## ⦿ **Lýze buněk**

- > mechanicky (drcení, vortex)
- > fyzikálně (ultrazvukem, snížení/zvýšení teploty)
- > chemicky (detergent )

## ⦿ **Chemicky** – složení lyzačního roztoku

- > detergent (např. 1% SDS, NP-40)
- > sůl (NaCl)
- > pufr (TRIS)
- > chelatační činidlo (EDTA )

# Čistota a koncentrace DNA

## Spektrofotometrie

- DNA/RNA báze absorbují UV záření (236-300 nm)

- absorpční maximum

  - pro nukleové kyseliny **260 nm**

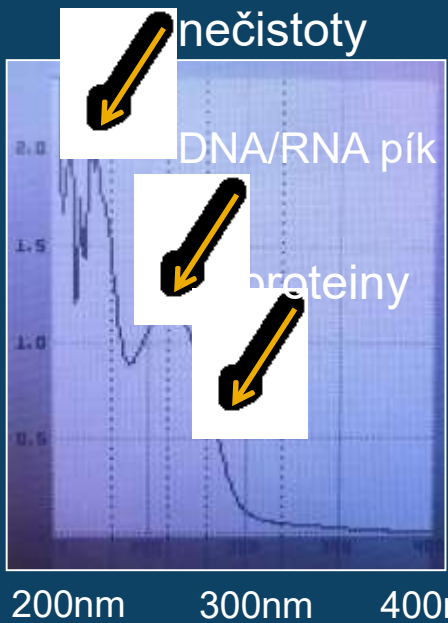
  - pro proteiny **280 nm**

  - pro malé organické molekuly **230 nm**

→ koncentrace DNA: při 260 nm

→ čistota DNA dána poměry 260/280 nm (1,6-2,0)

260/230 nm (2,0-2,5)



A230	1.501 A
A260	1.198 A
A280	0.741 A
A320	0.054 A
<b>A260/A280</b>	
1.685	
<b>A260/A230</b>	
0.791	

## ● Izolovaná DNA



A230	0.365 A
A260	0.728 A
A280	0.369 A
A320	0.008 A
<b>A260/A280</b>	
1.994	
<b>A260/A230</b>	
2.017	

## ● Přechištěná DNA

(0.3M octan sodný,  
95% ethanol)

# Čistota a koncentrace DNA

## ● Gelová elektroforéza s fluorescenčními barvami (orientační)

- DNA s navázanými barvami se v gelu zviditelní
- Gel obsahuje vzorek a DNA standardu o známé koncentraci – porovnání světelných intenzit

# Gelová elektroforéza

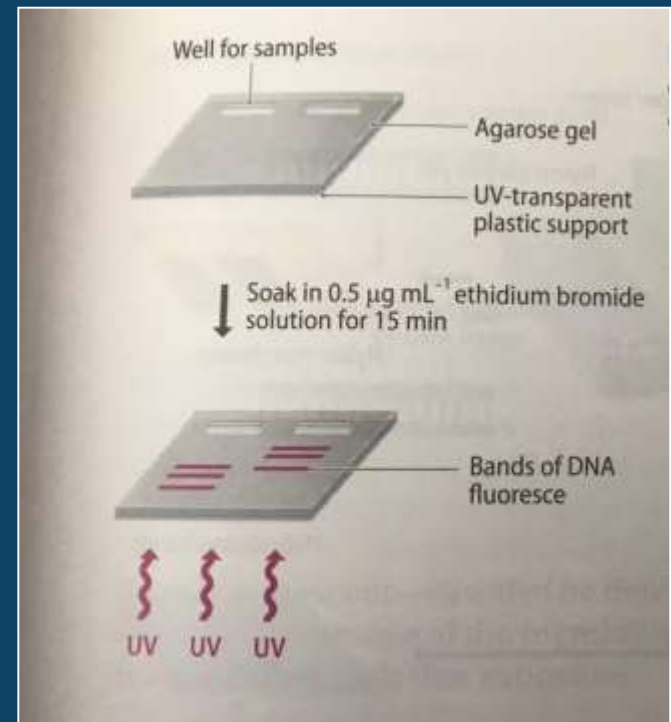
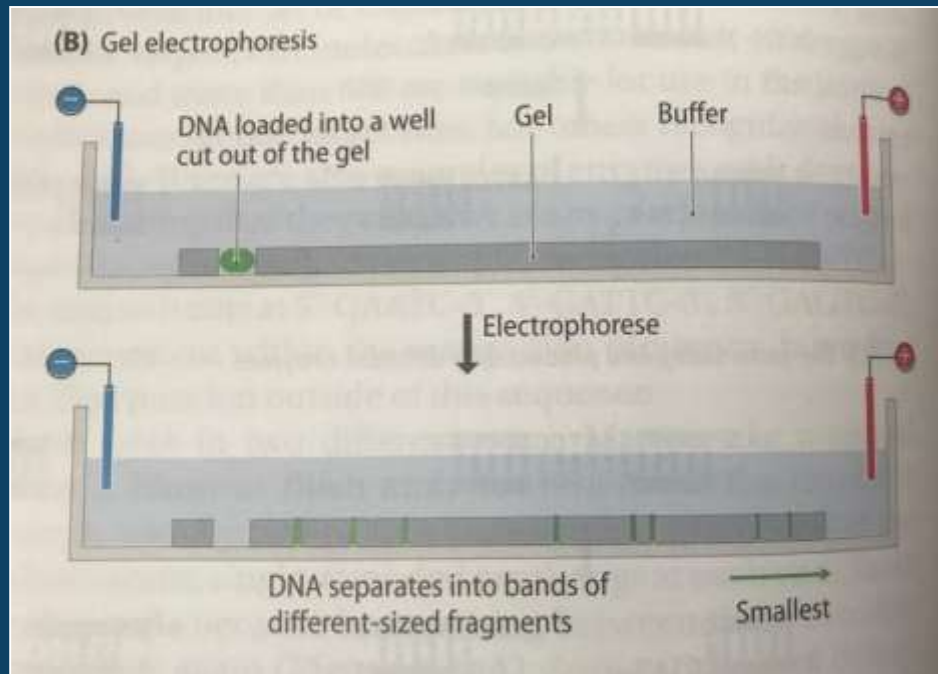
- separační metoda

rozdělení fragmentů DNA (RNA, molekul proteinů) podle velikosti na principu **pohybu nabitých molekul v elektrickém poli**

- ⦿ DNA obsahuje záporně nabitě fosfátové skupiny → pohyb od katody (-) k anodě (+)
- ⦿ Rychlost pohybu závisí na délce fragmentu nepřímě úměrně

# Gelová elektroforéza

- separační metoda



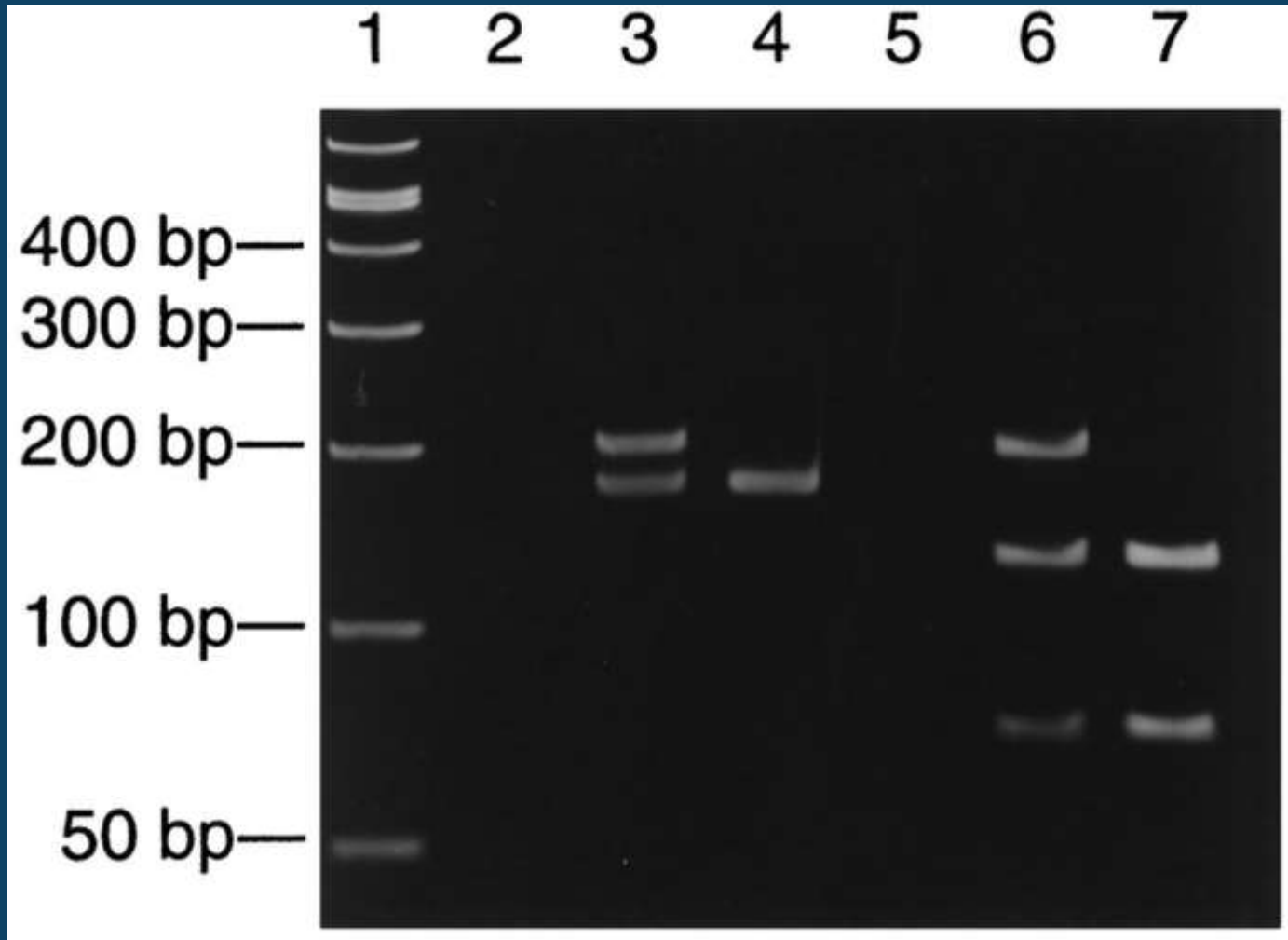
- Gel – síťovitá struktura polymerních molekul s póry

agaróza x polyakrylamid

- > Různá rozlišovací schopnost: **polyakrylamid** schopen rozlišit fragmenty DNA lišící se o jeden nukleotid **agaróza** rozdělí fragmenty lišící se min. 10ti nukleotidy (širší rozpětí – stovky párů bází)

- **Etidiumbromid** – barva přidávaná do gelu

- > Váže se do struktury DNA
- > Po expozici UV excituje fotony (svítí)



↓  
MW marker  
(bp = páry bází)

