



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



20. dubna 2020

Reg. č. projektu:
CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_015/0002362

METODY STUDIA DNA I

Přednáška k praktikům z molekulární biologie pro letní semestr 2020

Autor: kolektiv autorů pod vedením prof. MUDr. Petra Zacha, CSc. z Ústavu Anatomie 3. LF UK

Mgr. Petr Daniel

Ústav biochemie, buněčné a molekulární biologie 3. LF UK

petr.daniel@lf3.cuni.cz

Organizace praktik MB LS2020

- ⦿ Z důvodu pandemie koronaviru SARS-CoV-2 praktika z molekulární biologie probíhají distanční formou studia
- ⦿ Prosím, shlédněte audiovizuální záznam z praktik

Podmínky udělení zápočtu z praktik:

- ⦿ **Vypracování protokolu** (možno **ve skupinách**, max 3 studenti)
- ⦿ Templát protokolu bude k dispozici ke stažení
- ⦿ Podrobnosti budou zveřejněny na výuce a v prezentaci k praktikům

Diagnostika

- ◎ **DNA** – sekvence genů, repetitivní sekvence nekódujících oblastí
- ◎ **Proteinů**
- } ◎ **RNA** genová exprese

Zdroje nukleových kyselin

- ◎ **DNA určitého genu**
 - všechny jaderné buňky
- ◎ **RNA určitého genu**
 - jenom buňky, kde se daný gen exprimuje

Proč se používá diagnostika nukleových kyselin

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

Polymorfismus DNA, 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)

Typy polymorfismu DNA

- ◎ variabilita sekvence DNA mezi rozdílnými jedinci téhož druhu (99,9% lidé mezi sebou x 98,5% člověk šimpanz)

- ◎ **SNPs** (snips) – single nucleotide polymorphisms

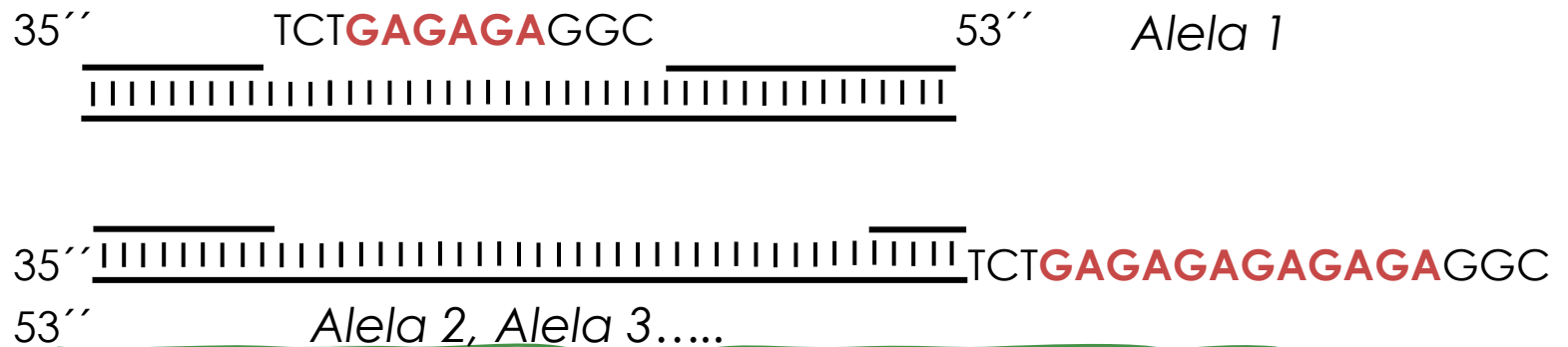
- záměna 1 nt za jiný

- obvykle 2 alely
- rovnoměrně rozložené po genomu – mapování
- detekce - RFLP, sekvenování, DNA čipy



- ◎ **Minisatelite** (VNTRs) – *variable number of tandem repeats*
 - opakující se jednotka až 25 bp
 - často v telomerických oblastech, nejsou náhodně rozmístěné
 - velikost několik kb – nevýhodné pro detekci PCR
- ◎ **Mikrosatelite** (STRs) – *short tandem repeats*

- 10-30X opakující se jednotka max. 6 bp
- 3 miliony v lidské DNA
- převažují krátká opakování (TATATATA, CTGCTGCTGCTG)
- velikost do 300 bp – vhodné pro detekci PCR



Charakteristika diagnostiky DNA

Detekce určitého polymorfizmu daného predispozičního genu

◎ CÍLENÉ ANALÝZY

- lokalizace a celá sekvence genu je známá
- mutace genu je známá
- vyšetření členů rodiny není nutné

○ **KOMPLETNÍ ANALÝZY**

- Lokalizace a celá sekvence genu je známá
- Mutace genu jsou neznámé
- Vyšetření členů rodiny je nezbytné

Co se detekuje?

- Monogenní a polygenní dědičné choroby
- Typizace nádorů
- Detekce infekčního agens (viry, bakterie aj.)
- Progrese choroby během léčby

- ⦿ Identifikace osob ve forenzní medicíně
- ⦿ HLA-typizace v případě transplantace
- ...
- ⦿ Prevence - vyšetření: - preimplantační
 - prenatální
 - presymptomatické

Progrese nádorového onemocnění a cílená léčba

Nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC)

- ⦿ mutace v receptoru pro epiteliální růstový faktor **EGFR**
(delece exonu 19, mutace L858R)

○ inhibitory tyrosinkinázy (TKI)

1. generace: *Gefitinib*,
Erlotinib

2. generace: *Afatinib*



3. generace: *Osimertinib*

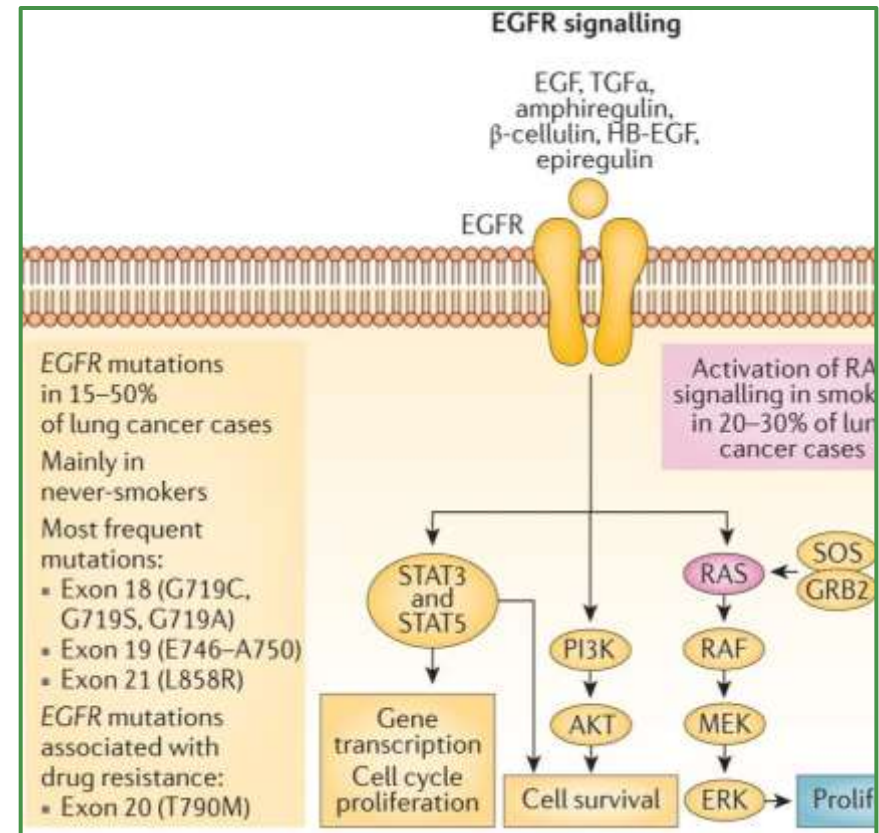
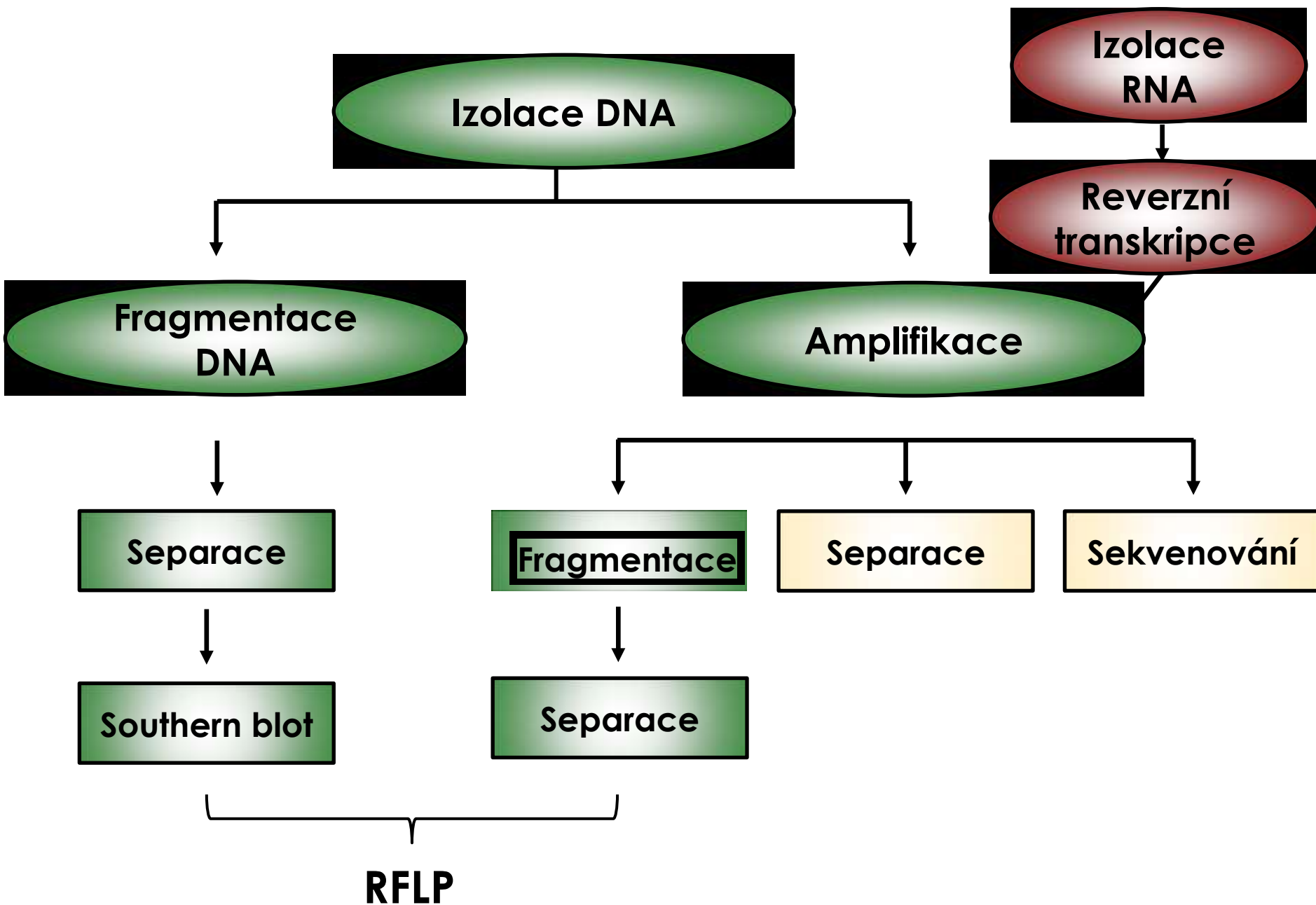


Schéma postupu detekce mutací a polymorfismu



Izolace DNA

- ⊙ Výběr metody – kvalita a kvantita DNA
 - ⊙ **Kity** (zachycení a promytí DNA na silikátové koloně), nebo
 - ⊙ **Home-made metody** (zejm. **fenol-chloroformová extrakce**, jiné postupy)

- ⊙ Základní kroky:
 - ⊙ **1. Lýze buněk** (uvolnění bun. obsahu do roztoku) ⊙ **2. Odstranění makromolekul (proteiny/RNA)**
 - Inkubace s **RNázou A** (degradace RNA)
 - Proteinázou K** (degradace proteinů)
 - ⊙ **3. Precipitace DNA ethanolem** (odstranění solí a nečistot)
 - ⊙ **4. Rozpuštění DNA** ve vodě či v pufru

Izolace DNA

⊙ Lýze buněk

- ⊙ **mechanicky** (drcení, vortex)
- ⊙ **fyzikálně** (ultrazvukem, snížení/zvýšení teploty)
- ⊙ **chemicky** (detergent) – např. v komerčních kitech

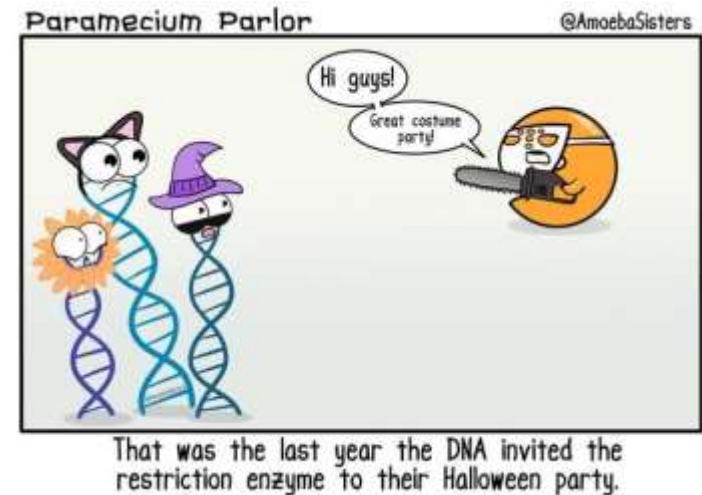
(Metody rozbití buněk se často kombinují.)

⊙ Chemicky – příklad složení lyzačního roztoku:

- > **pufr**, TRIS-HCl, pH 8,0 – udržení optimálního pH
- > **chelatační činidlo**, 1 mM EDTA – inhibice enzymů
- > **osmolarita**, 0.2 mM CaCl₂
- > **detergent**, např. 0,001% SDS (silný iontový detergent)
0,001% Triton X-100 (neiontový detergent)

Polymorfismus délky restričních fragmentů, RFLP

- Využívá tzv. **restrikční endonukleázy** II. třídy (zkrác. **restriktázy**)
 - **Restrikční** = součástí restričně-modifikačního (obranného) systému bakterie před fágy
 - **Nukleáza** = obecně enzym štěpící nukleovou kyselinu
 - **Exonukleáza** = štěpí (degraduje) NK “od konce”
 - † 5' → 3' exonukleáza
 - † 3' → 5' exonukleáza
 - **Endonukleáza** = štěpí NK “uprostřed” sekvence
 - † Specificky
 - † Nespecificky
- Některá restriční místa jsou polymorfní
- 10^5 RFLP / genom



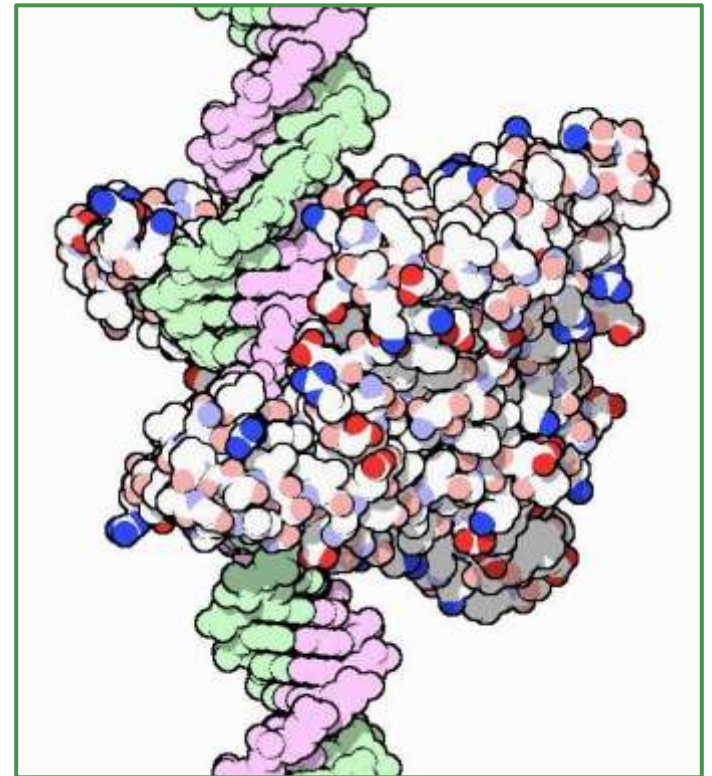
Vlastnosti restriktáz II. třídy

- Enzym, který **rozpozná cílovou sekvenci** („restrikční místo“) na dvouřetězcové DNA a následně provede specificky **štěpení fosfodiesterové vazby** uvnitř, nebo v blízkosti této sekvence (= molekulární nůžky)
- Za optimálních podmínek enzym štěpí všechna restrikční místa
- Komerčně více než 700 enzymů
- Názvosloví

	lat. název	kmen	pořadí
EcoRI	<i>Escherichia</i>	coli	RY13 I

BamHI *Bacillus amyloliquefaciens* **H I**

XhoI *Xanthomonas holcicola* **I**



Vlastnosti restriktáz II. třídy

- Sekvenčně **specifická nukleázová aktivita**, nevyžaduje ATP
 - Restrikčním místem je krátký **palindrom** (4-8 nt)



Lidská DNA

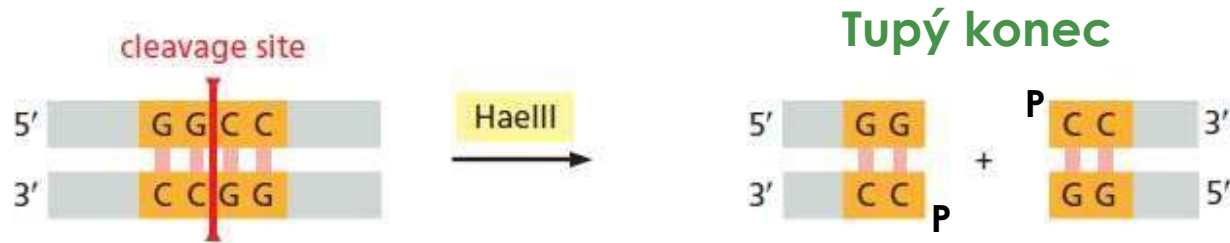


Escherichia coli DNA

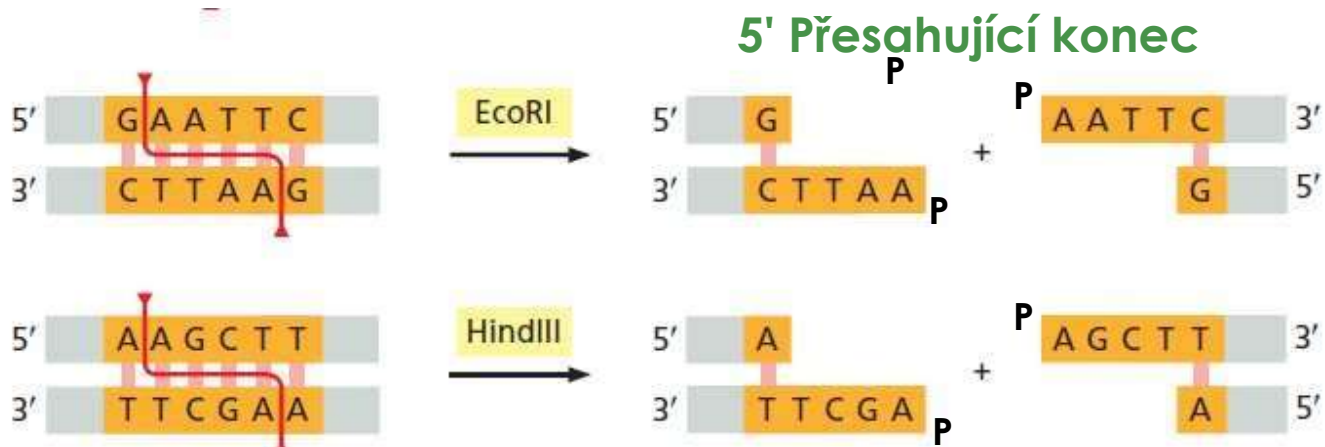
- **Methylační aktivita úplně chybí**
- Homodimer
- **Enzymová aktivita** = unit (1 μg DNA za 1 hod při opt. podmínkách)
- **Hvězdičková aktivita** – nesespecifická aktivita za suboptimálních podmínek
- Vznik restrikčních fragmentů s různými typy konců:

- **Lepivé** konce (kohezní, přesahující) (obr. A)
- **Tupé** konce (obr. B)

A



B



Průměrná délka fragmentu po štěpení

$$N = 4^n$$

N – průměrná délka fragmentu DNA po štěpení náhodné sekvence

n – počet nukleotidů restričního místa

Př. Restriktáza rozpoznávající 4-nukleotidovou sekvenci

$$N = 4^4 = 256 \quad 3.2\text{Gbp}/256\text{bp} = 12\,500\,000 \text{ fragmentů}$$

Př. Restriktáza rozpoznávající 6-nukleotidovou sekvenci

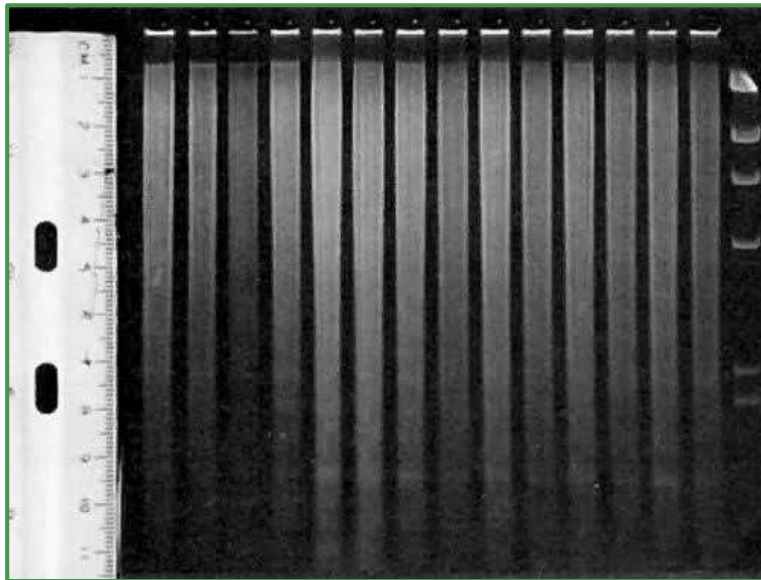
$$N = 4^6 = 4096 \quad 3.2\text{Gbp}/4096\text{bp} = 781\,250 \text{ fragmentů}$$

Southern blot

- Přenos rozdělených DNA fragmentů z gelu na nylonovou membránu
- sir Edwin Southern
- DNA v gelu je nepřístupná pro hybridizační sondu



[i/Edwin_Southernhttps://en.wikipedia.org/wik](https://en.wikipedia.org/wiki/Edwin_Southern)



- Gelová elektroforéza chromosomální DNA po štěpení restriktázou *Xba*I
- Smír (jednotlivé proužky DNA nejdou identifikovat)

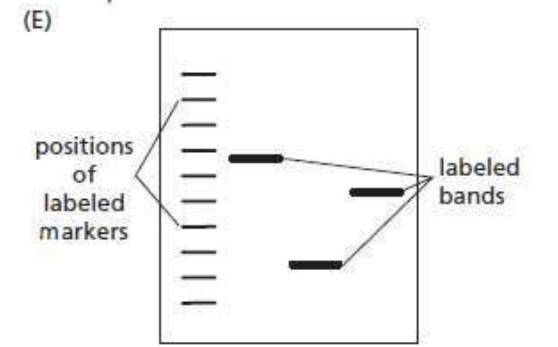
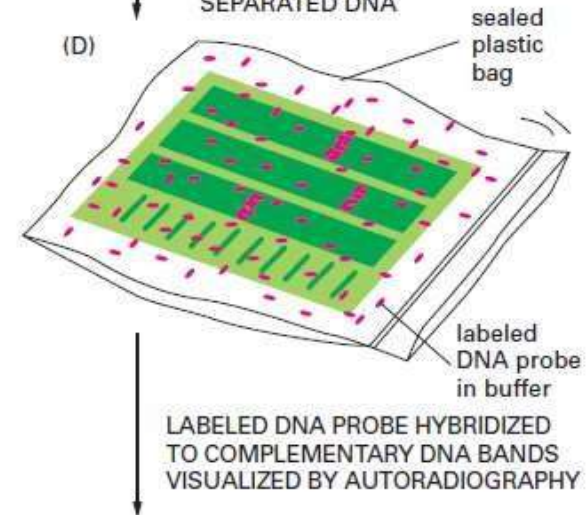
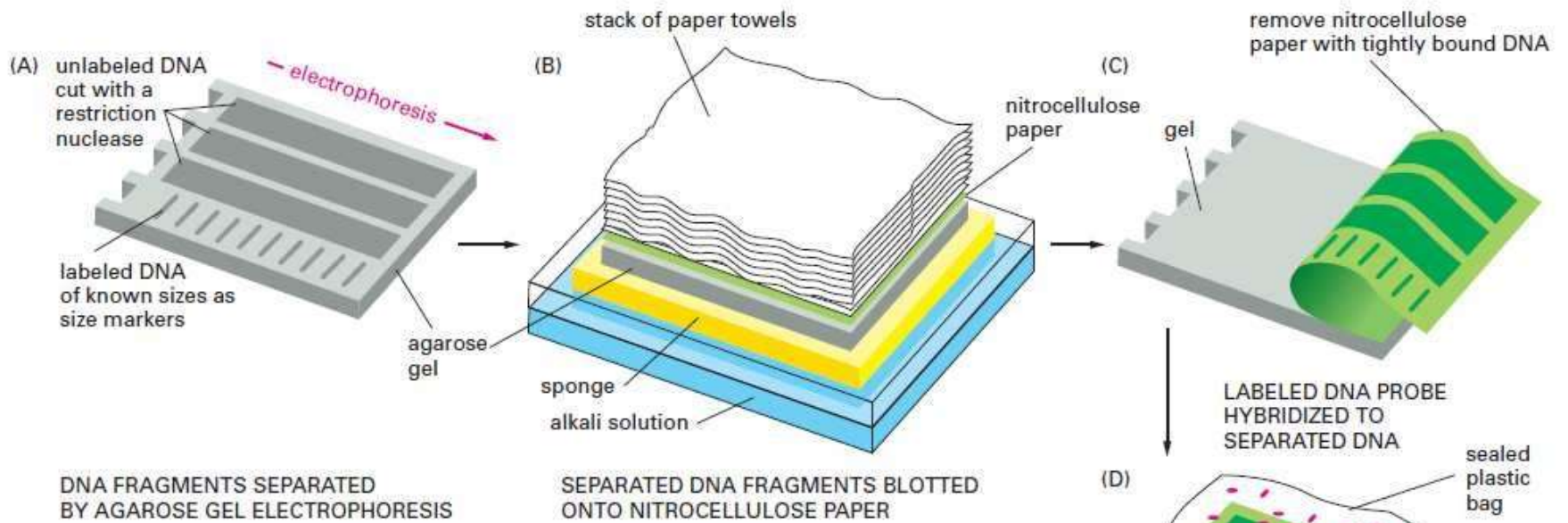
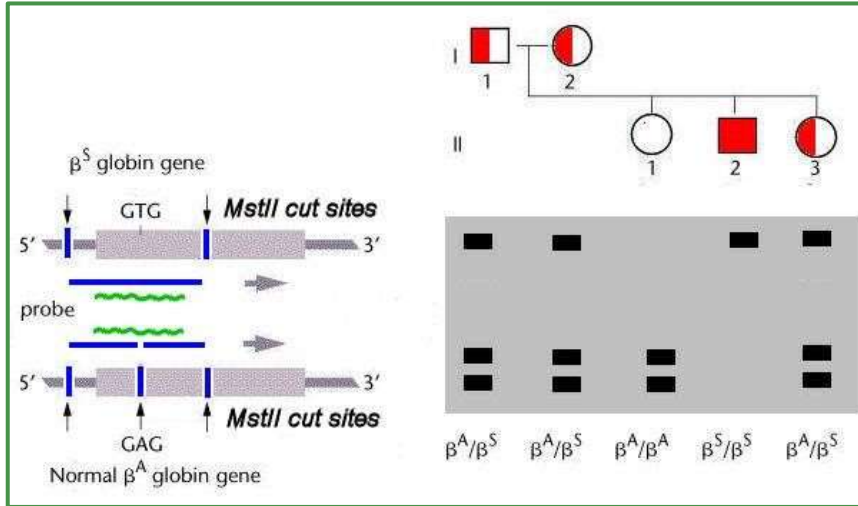


Figure 10-5 Gel-transfer hybridization, or Southern blotting, is used to detect specific DNA fragments. (A) The mixture of double-stranded DNA fragments generated by restriction nuclease treatment of DNA is separated according to length by electrophoresis. (B) A sheet of either nitrocellulose paper or 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.

Princip techniky Southernblot

Příklad – srpkovitá anémie

- Autosomálně recesivní



Zápis: c.20A>T, p.Glu7Val

- Bsu36I** (*MstII*) rozpoznává “CCTNAGG“ sekvenci

- Anémie, vyšší riziko infekcí

- Inkompletní dominance HbS
- Mutovaná alela **HbS** se od zdravé alely **HbA** liší záměnou nukleotidu (A je nahrazen T na 20. pozici v kódujícím úseku DNA)

- Mění se 7. kodón GAG (Val) na GTG (Glu)

- Protein **hemoglobin S** tvoří vlákna, která mění tvar erytrocytů na srpkovitý

- Ucpávání a poškození vlásečnic – bolesti

PCR = polymerázová řetězová reakce



● **Kary B. Mullis** – 1983 vynalezl

PCR

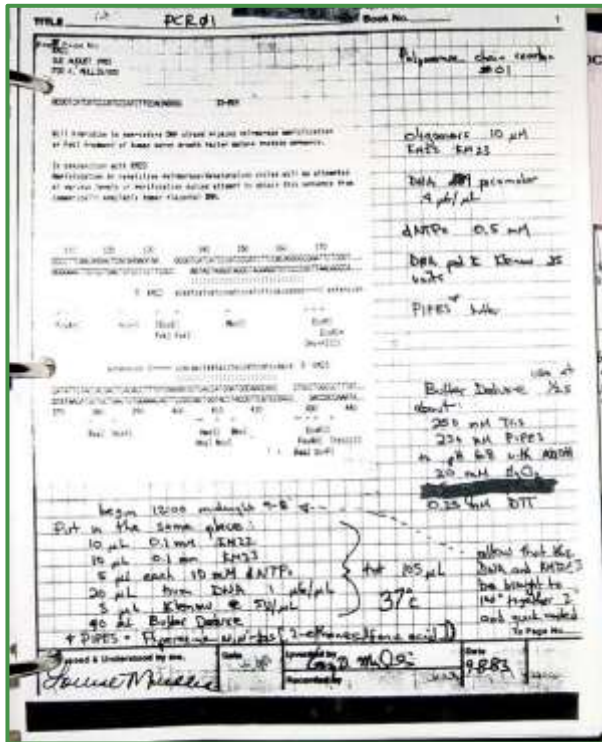
● **in vitro syntéza úseku DNA** pomocí páru

oligonukleotidů (primerů), DNA
templátu, nukleotidů a
termostabilní polymerázy

● Denaturace → Reasociace →

Syntéza

● Exponenciální výtěžek



Základní komponenty PCR

- ⊙ **Templátová DNA**
- ⊙ **Pár primerů** (primer přímý a primer zpětný)
- ⊙ **Volné nukleotidy** (dNTP)
- ⊙ **Termostabilní DNA dependentní DNA polymeráza**
- ⊙ **Pufr**
- ⊙ **Aktivátor reakce** (ionty Mg^{2+})

Další komponenty – zvyšují výtěžek reakce

- ⊙ **Betain, DMSO** – GC vlásenky
- ⊙ **Formamid** – snižuje nespecifické nasedání primeru
- ⊙ **Spermidin** – poškození DNA radikály
- ⊙ **BSA** – vazba na stěny zkumavky
- ⊙ **Tween 20** – snižuje efekt zbytkového SDS v pufru

Templátová DNA

- ⦿ Množství chromozomální DNA pro PCR 100 – 500 ng
- ⦿ Pozor na kontaminace, především NUKLEÁZ
 - Všudypřítomné (na rukou, ale i na předmětech)
 - Obtížně se inaktivují
 - Používání špiček (testované na přítomnost nukleáz)
 - Pravidelně měnit rukavice
 - Příprava reakce ve sterilním boxu (UV)

RNA – váže Mg^{2+}

DNA – oddělené pipetování vzorků

Stanovení čistoty 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**

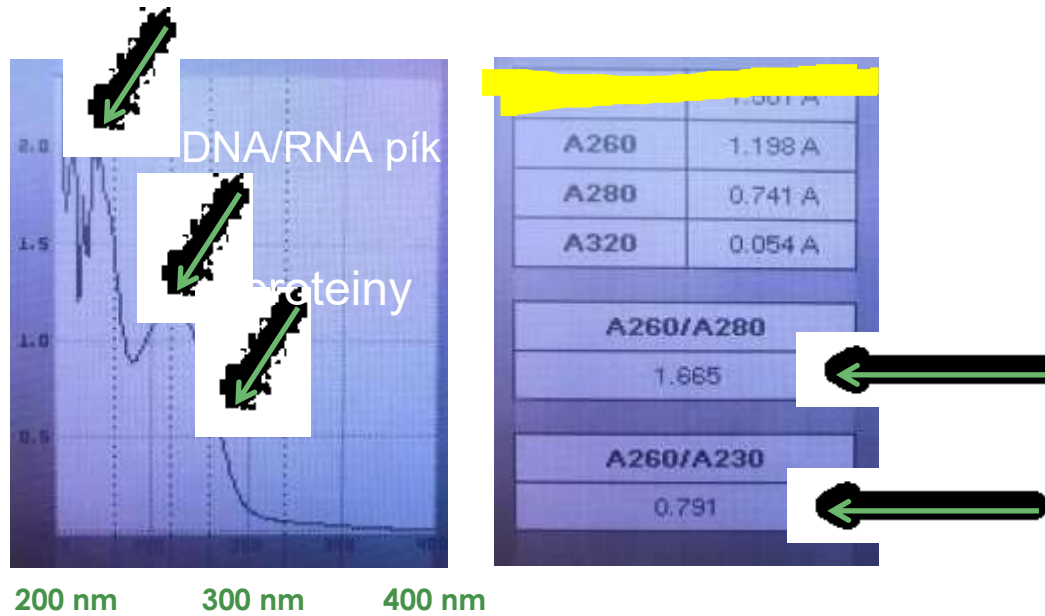


→ **koncentrace** DNA: při **260 nm**

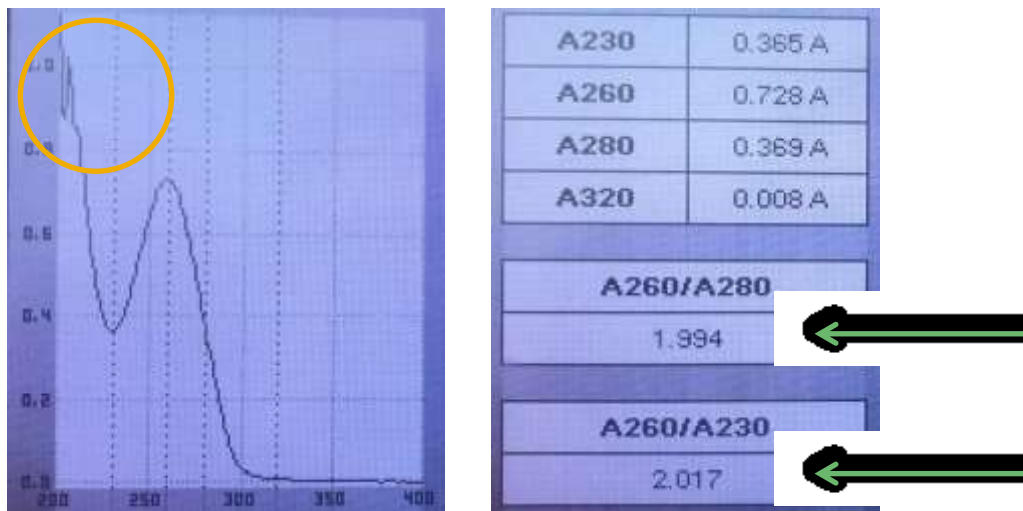
→ **čistota** DNA dána poměry **260/280 nm**

(1,6-2,0) a 260/230 nm (2,0 – 2,5)

⊙ Izolovaná DNA

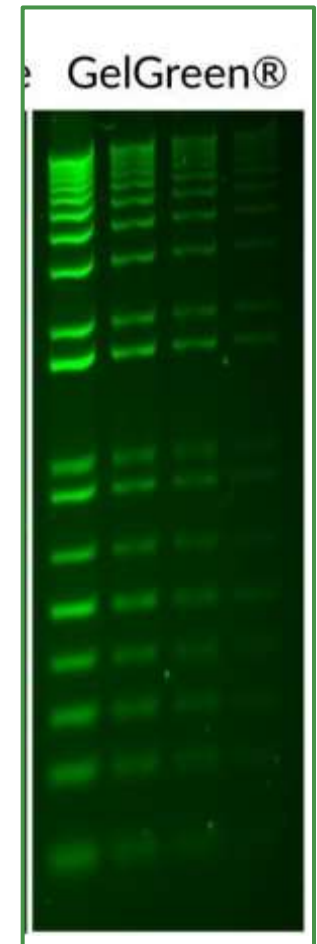


⊙ Přečištěná DNA



Stanovení čistoty a koncentrace DNA

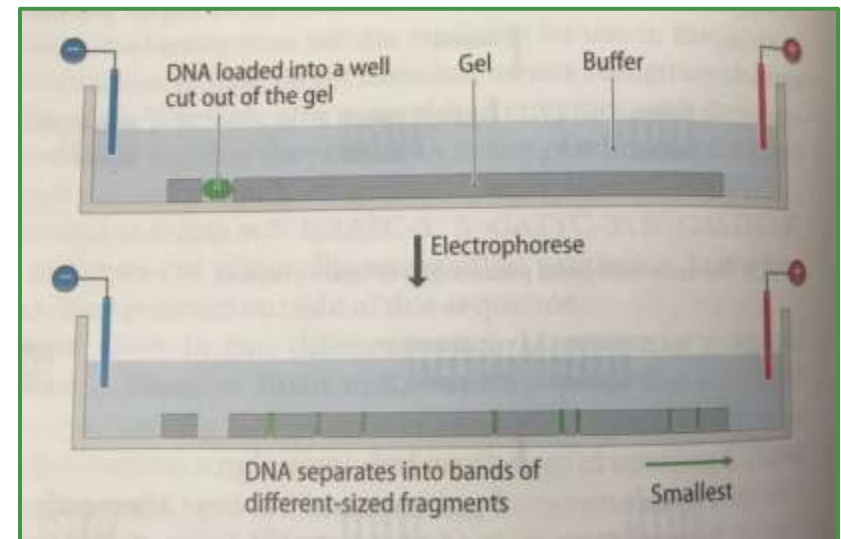
- ◎ **Gelová elektroforéza s fluorescenčními barvami** (orientační)
 - DNA s navázanými barvami se v gelu zviditelní
 - Gel obsahuje vzorek a DNA standardu o známé koncentraci – porovnání světelných intenzit



Agarózová gelová elektroforéza

separační metoda

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



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

- Gel – 3D síť z polymeru ● TAE / TBE + agaróza

- ⦿ **Agaróza / polyakrylamid**

- Různá rozlišovací schopnost:

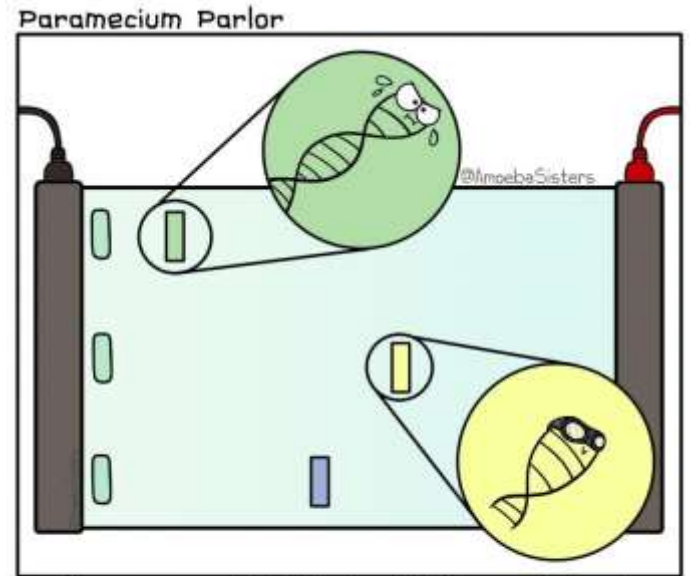
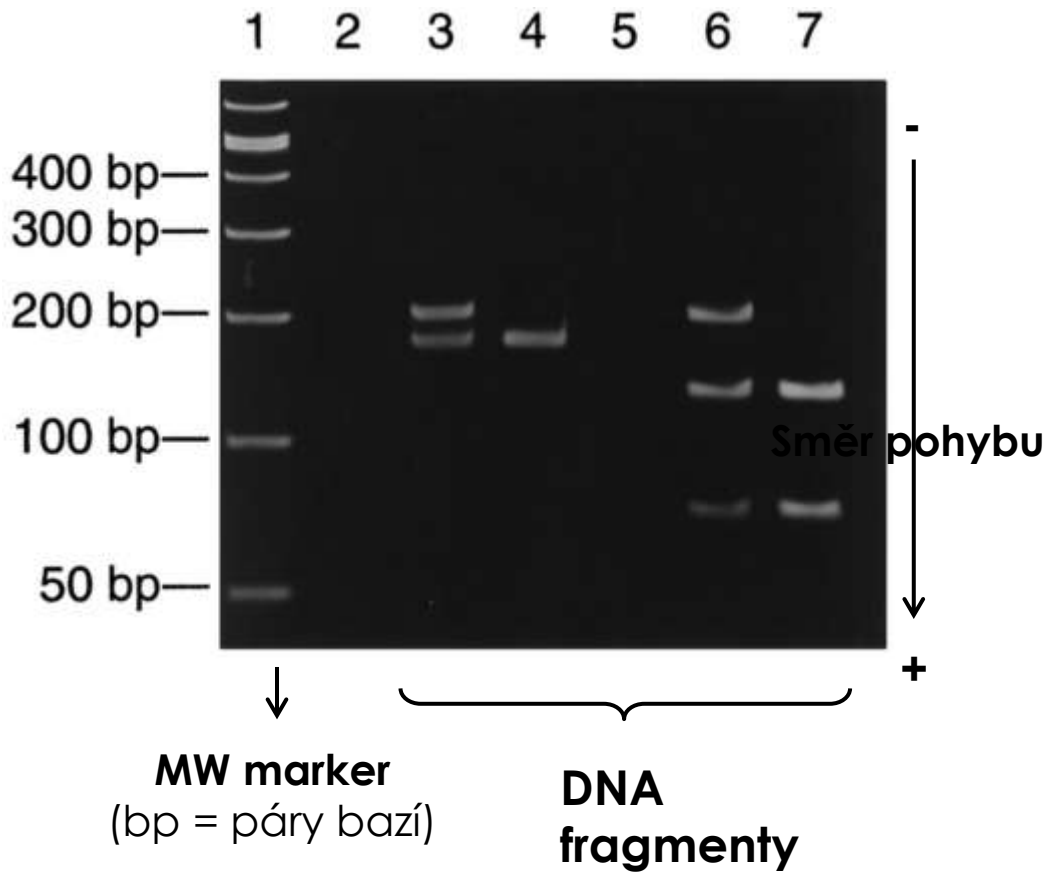
- polyakrylamid** schopen rozlišit fragmenty DNA lišící se o jeden nukleotid

- 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)



There was no doubt shorter DNA fragments had the advantage in the Great Gel Electrophoresis Race, but Larry still had a dream.