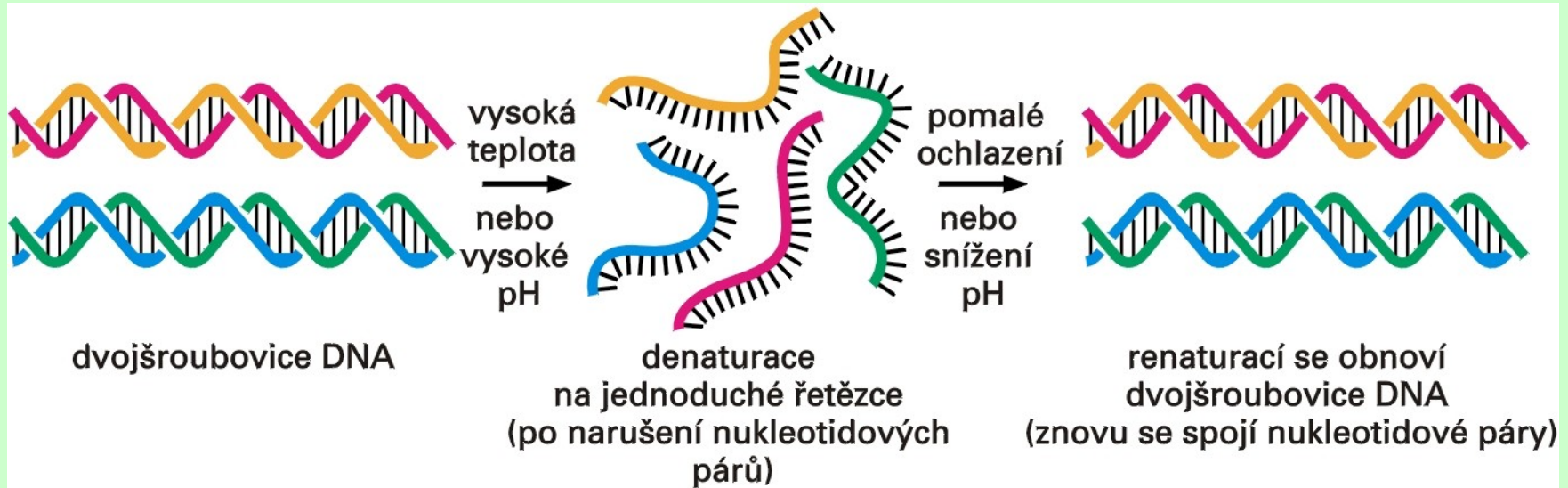


Hybridizace nukleových kyselin

Tvorba dvouřetězcových hybridů za dvou jednořetězcových a komplementárních molekul

Založena na schopnosti **denaturace a renaturace** DNA.

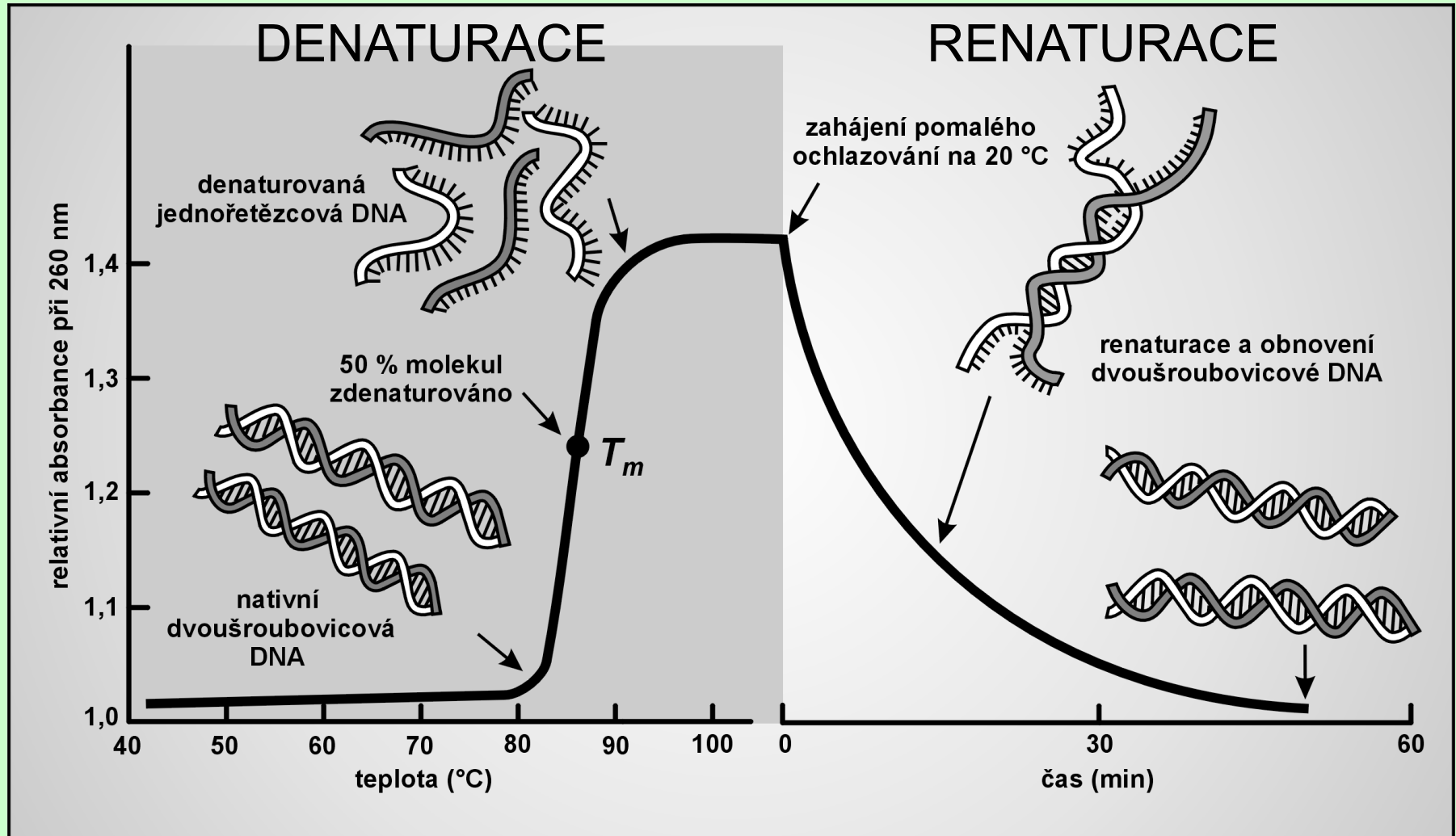
Denaturace a renaturace (hybridizace) DNA



Denaturace DNA

- oddělení komplementárních vláken DNA působením vysoké teploty (90-100°C), extrémních hodnot pH nebo denaturačních činidel (formamid, močovina)
- změna v uspořádání bazí při denaturaci zvyšuje absorpci světla při vlnové délce 260 nm (**hyperchromní efekt**)

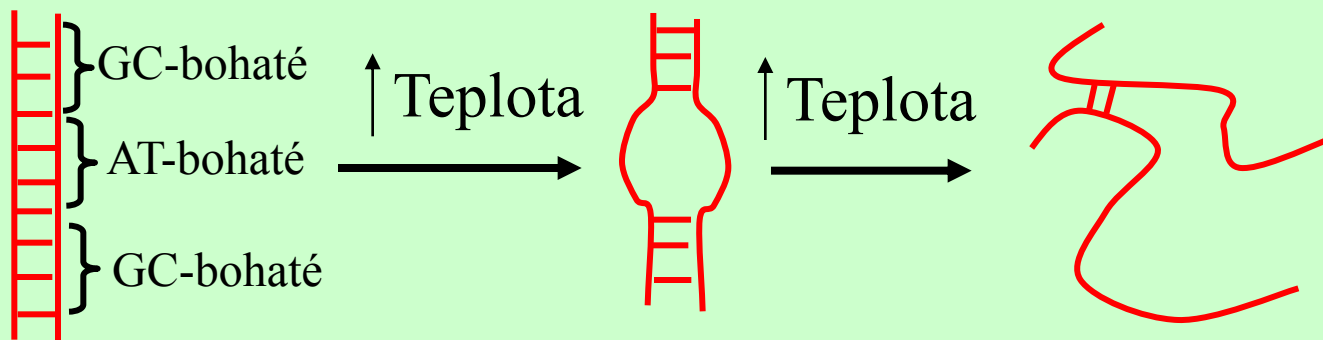
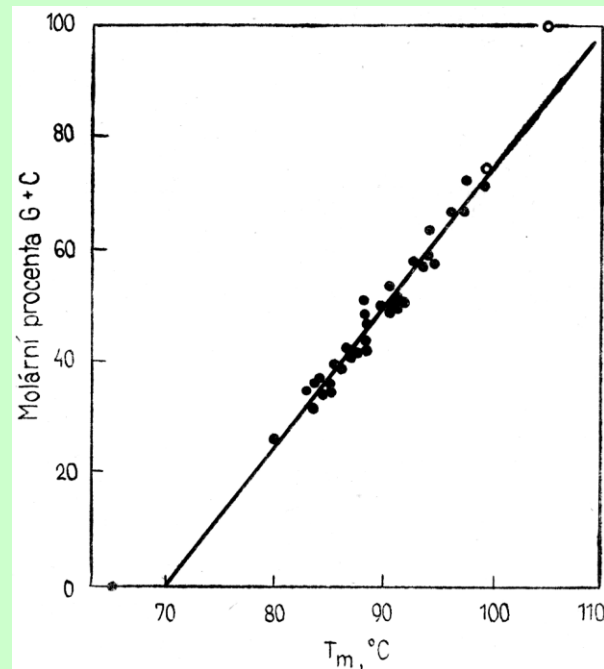
Průběh denaturace a renaturace sledovaný na základě absorpce UV-světla



Teplota tání DNA T_m - se lineárně zvyšuje s obsahem GC

Teplota tání (denaturace) závisí na čtyřech hlavních faktorech:

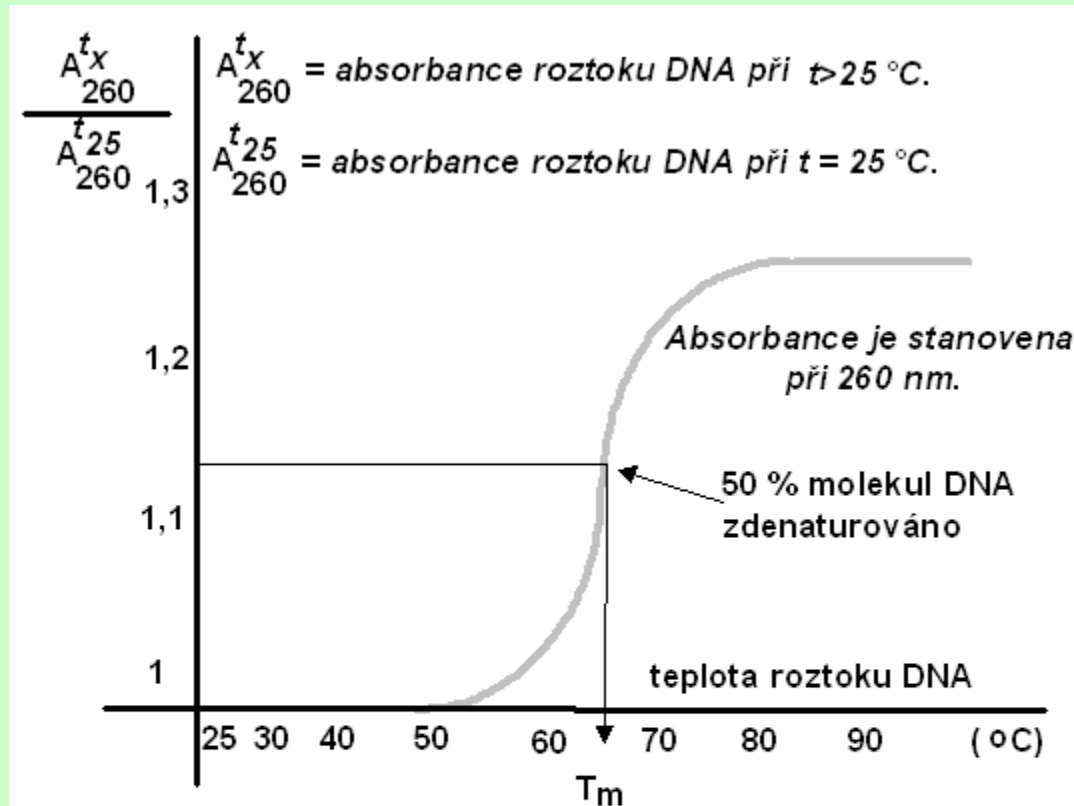
- obsahu GC (a AT)
- koncentraci solí
- délce sekvence
- přítomnosti nespárovaných úseků



Stanovení hodnoty T_m

Teplota, při které dochází k denaturaci DNA závisí na obsahu **guaninu a cytozinu** v DNA. **Čím více obsahuje GC-párů, tím vyšší teploty je zapotřebí k její denaturaci.** Rozmezí denaturačních teplot je zhruba 30 - 100 °C. Denuraci DNA provází **hyperchromní efekt**, tj. dochází ke **zvýšení absorbance ultrafialového světla**. Hyperchromní efekt je způsoben rozpadem dvouřetězcových molekul DNA na molekuly jednořetězcové, které absorbují UV-záření silněji než molekuly dvouřetězcové.

Teplota, při níž zdenaturovalo 50 % dvoušroubovicových molekul DNA, se označuje jako **teplota tání** a vyjadřuje se symbolem T_m . Tato teplota odpovídá inflexnímu bodu denaturační křivky.



V definovaném roztoku např. platí, že

$$T_m = 69,3 + 0,41 (GC).$$

Odtud

$$GC = \frac{T_m - 69,3}{0,41}.$$

Renaturace

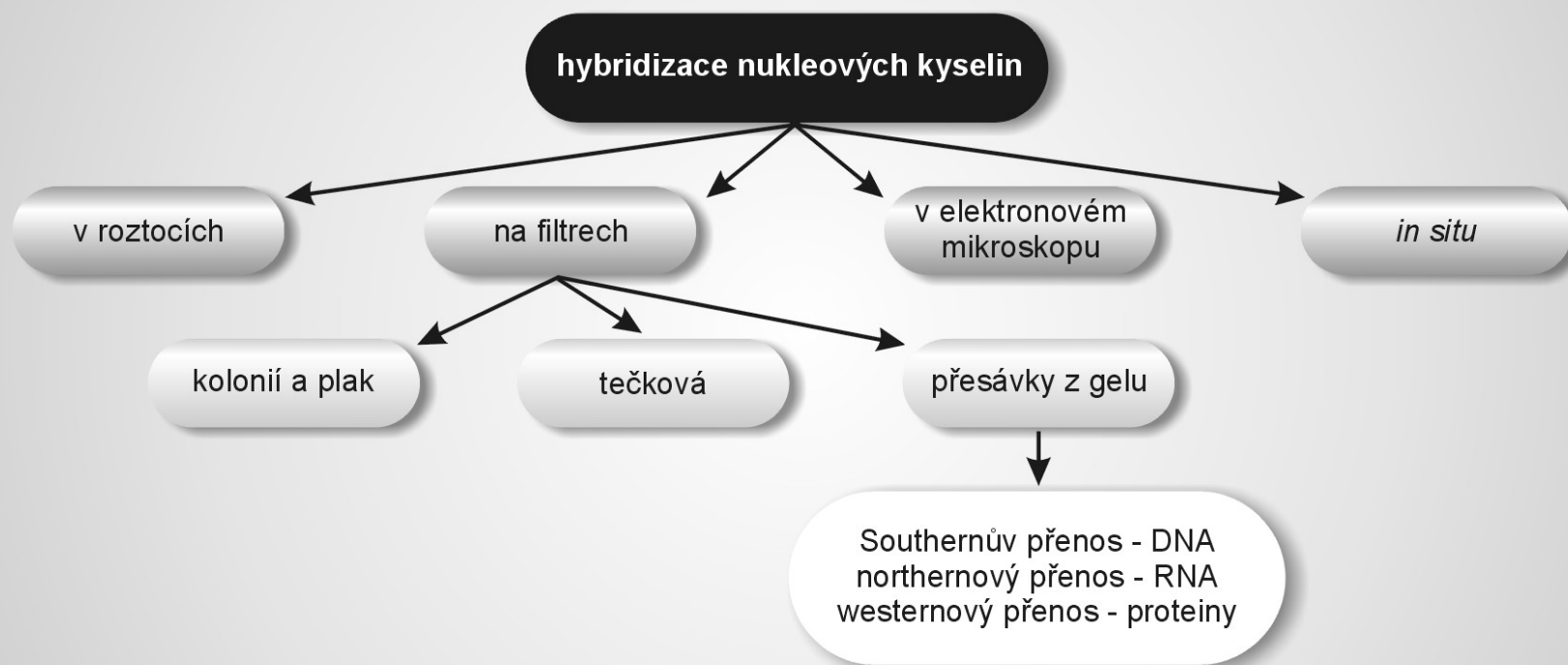
- opětná tvorba dvouřetězcových struktur z jednořetězcových polynukleotidů za vhodných připojovacích („annealing“) podmínek
- nastává při pomalém ochlazení (65°C) roztoku teplem denaturované DNA
- nenastává při prudkém ochlazení roztoku DNA s vyšší teplotou než T_m
- při renaturaci se mohou tvořit hybridní molekuly DNA/DNA, RNA/RNA i DNA/RNA
- rozsah renaturace odpovídá rozsahu komplementarity sekvencí

Využití hybridizace nukleových kyselin

- test komplementarity sekvencí (ve směsi mnoha molekul DNA budou hybridizovat jen ty, které jsou dostatečně komplementární) – z toho lze vyvozovat stupeň příbuznosti testovaných organismů
- testy genové exprese (hybridizovat mnohou i molekuly DNA a RNA)
- lokalizace genů na chromozomech
- testy paternity, identifikace osob, atd.
- amplifikace nukleových kyselin pomocí PCR (připojení primeru k templátu je rovněž typ hybridizační reakce)
- vyhledávání klonů nesoucích rekombinantní DNA
- čipové technologie („microarrays“)
- spojování fragmentů při klonování

- základem hybridizace je vždy značená sonda o známé nukleotidové sekvenci

Uspořádání hybridizačního experimentu je rozmanité podle povahy prostředí, ve kterém probíhá



Typy přenosu z gelu na membránu podle typu analyzovaných molekul

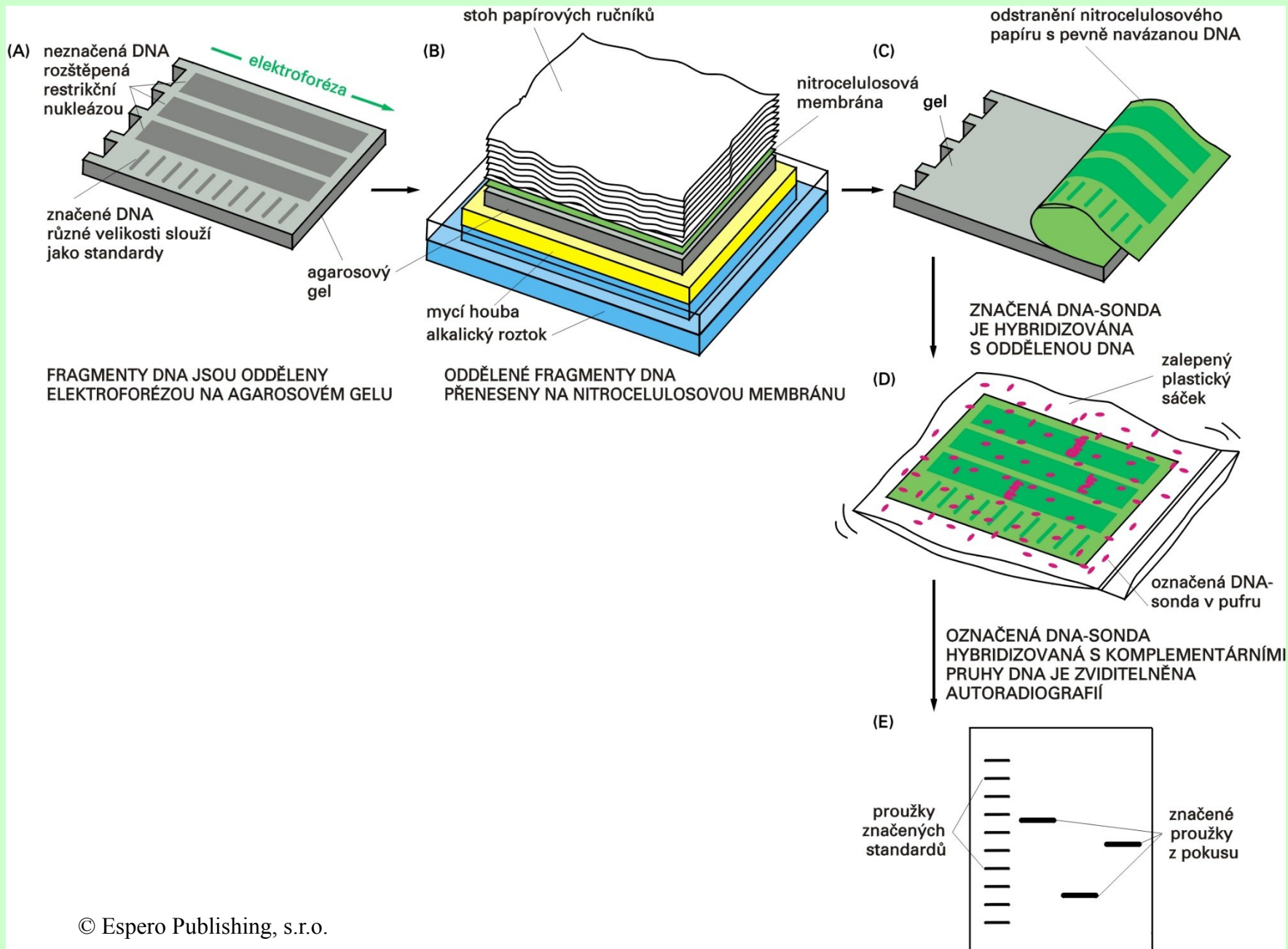
- Southernův přenos - DNA
- northernový přenos - RNA
- westernový přenos - proteiny
- southwesternový přenos - proteiny vázající DNA (sondou je DNA)
- northwesternový přenos - proteiny vázající RNA (sondou je RNA)

Typický hybridizační experiment - Southernův blot (přesávka)

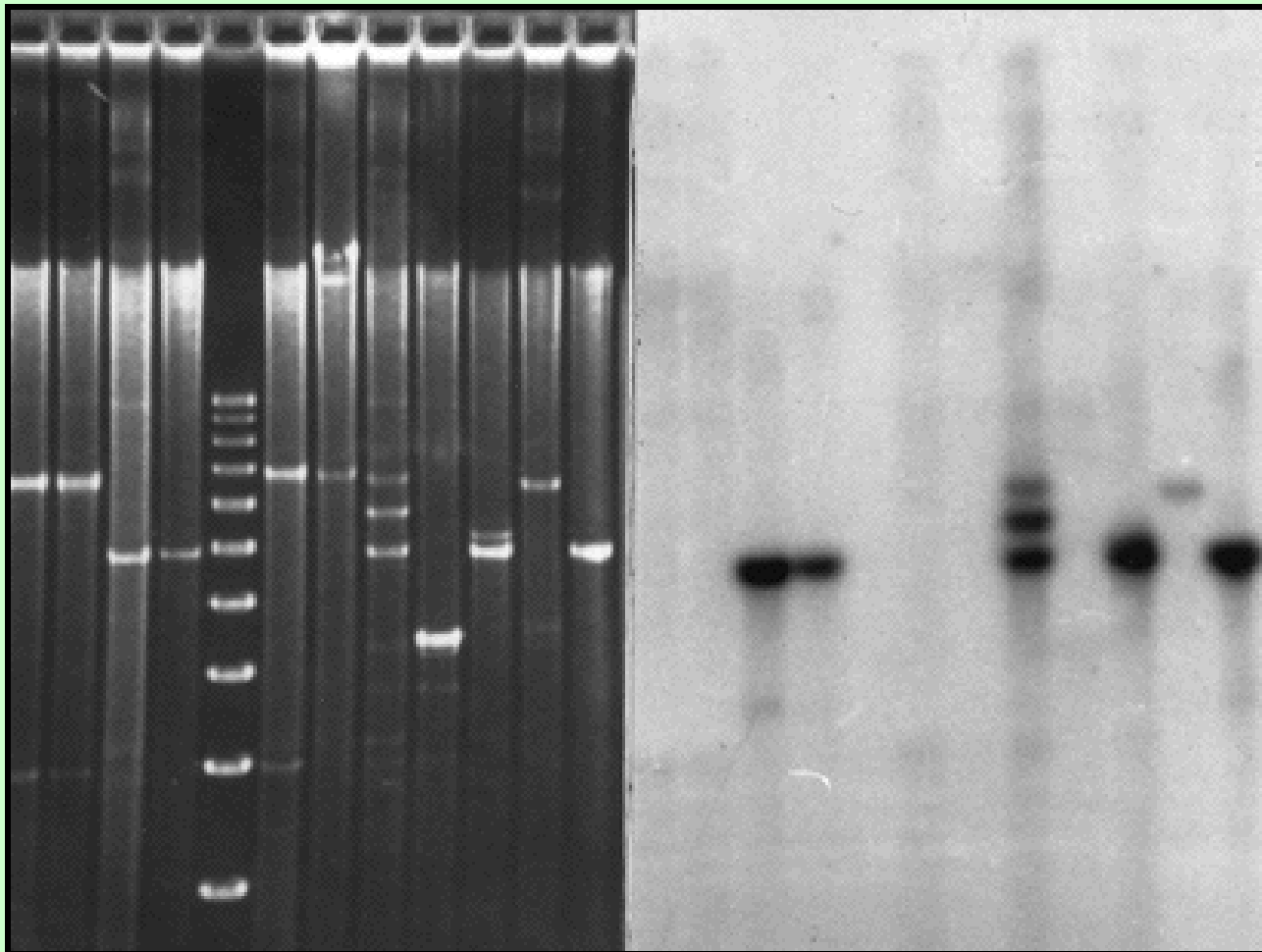
- technika vyvinuta E.M. Southernem
- běžné použití při detekci přítomnosti určitých genů v buněčné DNA nebo při sledování evoluční příbuznosti vzorků DNA z různých organismů

Southernův blot (přesávka) - postup

- rozdělení restrikčních fragmentů DNA daného vzorku gelovou elektroforézou
- denaturace DNA a přenos jednořetězcových fragmentů DNA na nylonový filtr („blotting“ - přesávka)
- inkubace filtru se značenou jednořetězcovou sondou
- dojde k hybridizaci sondy s komplementární sekvencí imobilizovanou filtru
- odmytí nenavázané sondy
- detekce navázané sondy - vizualizace hybridů (autoradiografie)



Southernův přenos



DNA obarvená
etidium bromidem

autoradiogram

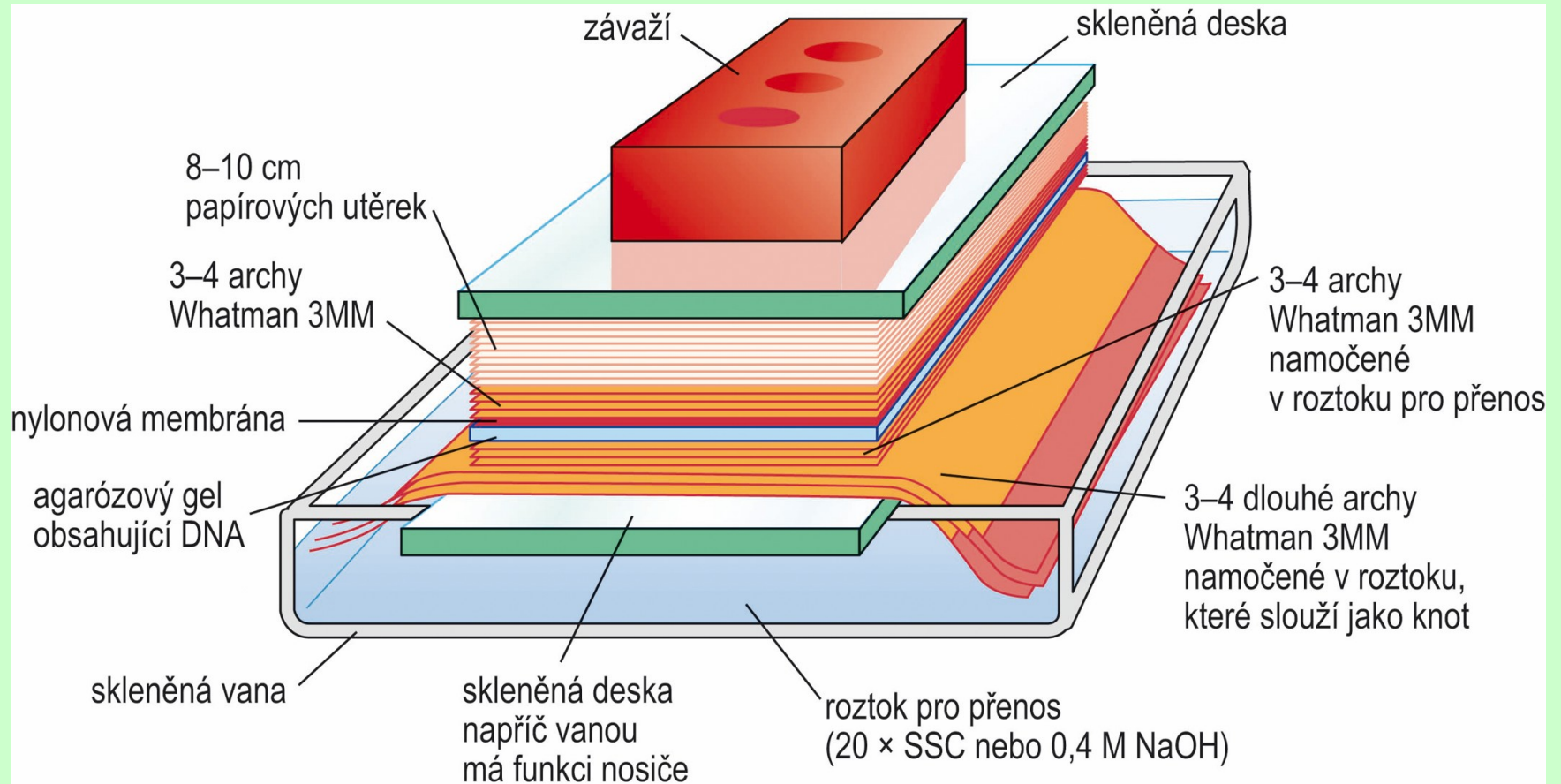
Ukázky provedení hybridizace

- [SouthernHybridization.mov](#)
- [hybrid2.mov](#)
- [hybrid3.mov](#)
- [hybrid4.mov](#)

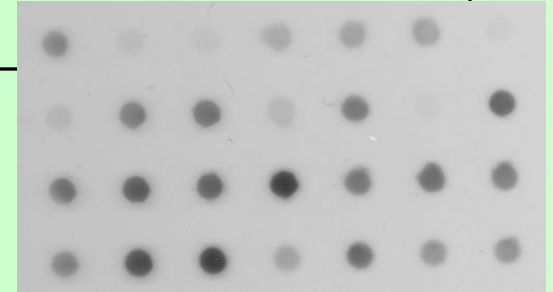
Způsoby přesávky („blotingu“)

- kapilární přenos
- elektroforetický přenos
- vakuový přenos

Kapilární přenos



Tečková hybridizace („dot blot“)



Postup:

- sonikace nebo restrikce genomové DNA; linearizace plazmidové DNA
- denaturace
- vzorky DNA nanесeny na podložku v podobě teček
- hybridizace se sondou
- hodnocení hybridizace (vizuálně, denzitometrem, β -spektrometrem)

Typy sond

- restriční fragmenty dvouřetězcové DNA (cDNA)
- mRNA izolovaná z buněk nebo tkání
- RNA transkripty *in vitro*
- syntetické oligonukleotidy (připravené podle sekvence aminokyselin)

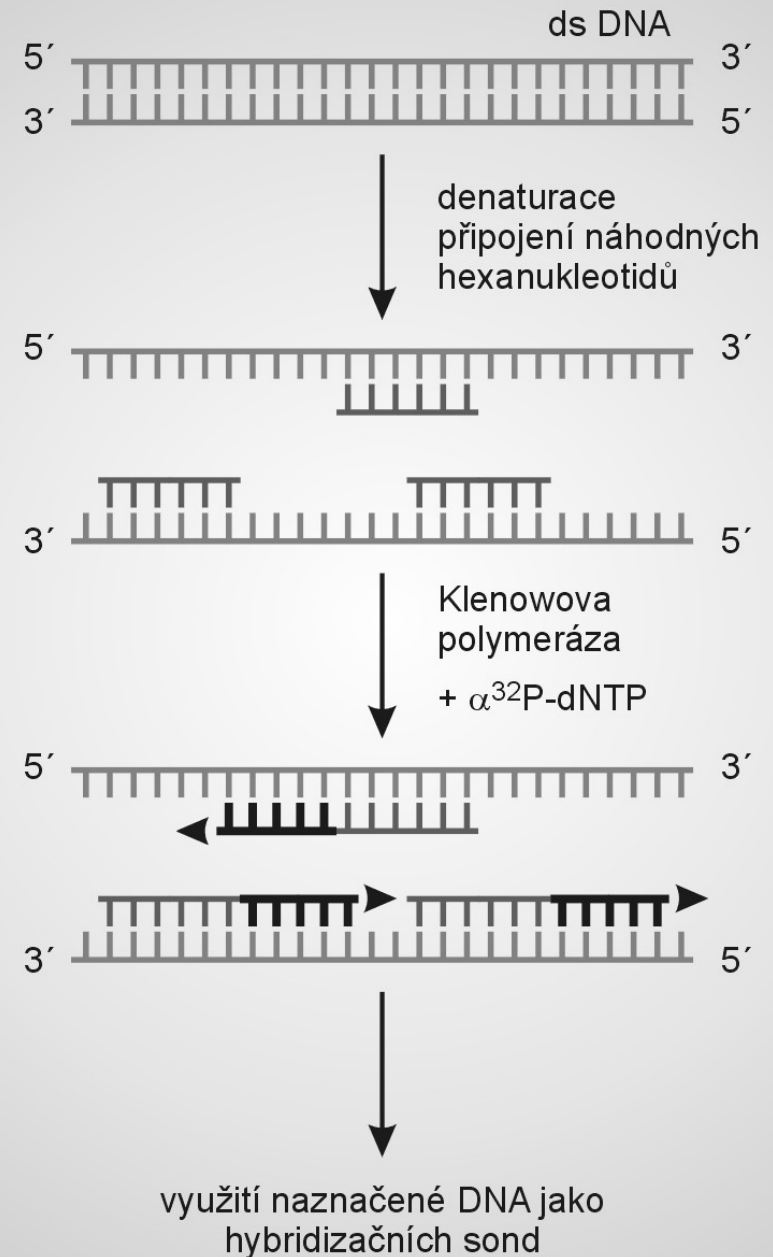
Způsoby značení sond

- pomocí náhodných hexanukleotidů („random primer DNA labeling“)
- posunem jednořetězcového zlomu („nick translation“)
- koncové značení
- značení vektoru s naklonovanou sondou
- značení transkriptů *in vitro* (RNA)

Značení DNA pomocí náhodných oligonukleotidů

„Random primer DNA labeling“

- k ssDNA se přidá směs hexanukleotidů o různé sekvenci
- k těmto primerům připojuje DNA polymeráza značené nukleotidy



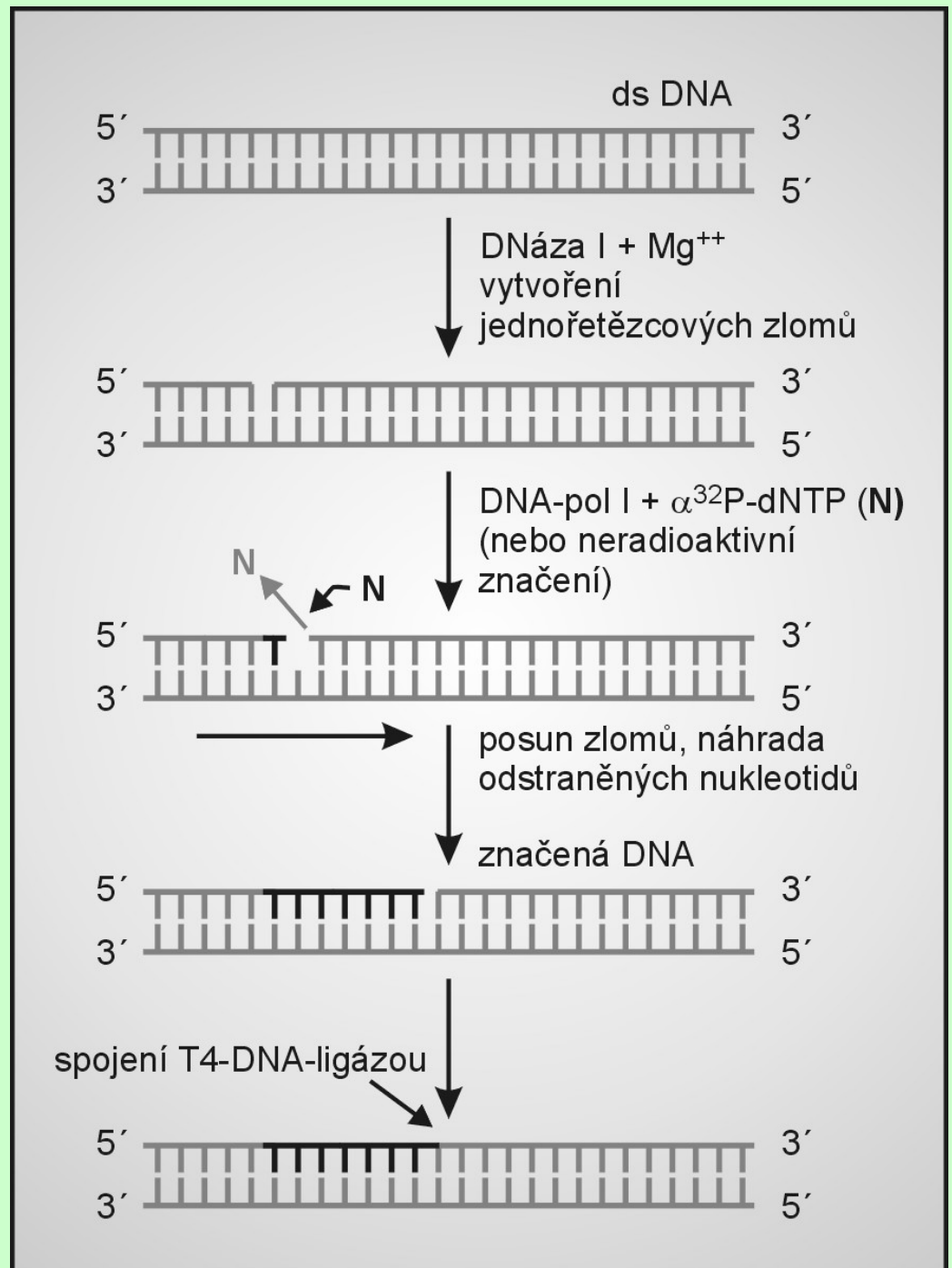
Značení DNA posunem jednořetězcového zlomu

„Nick translation“

Vytvoření náhodných
jednořetězcových zlomů
DNázou I

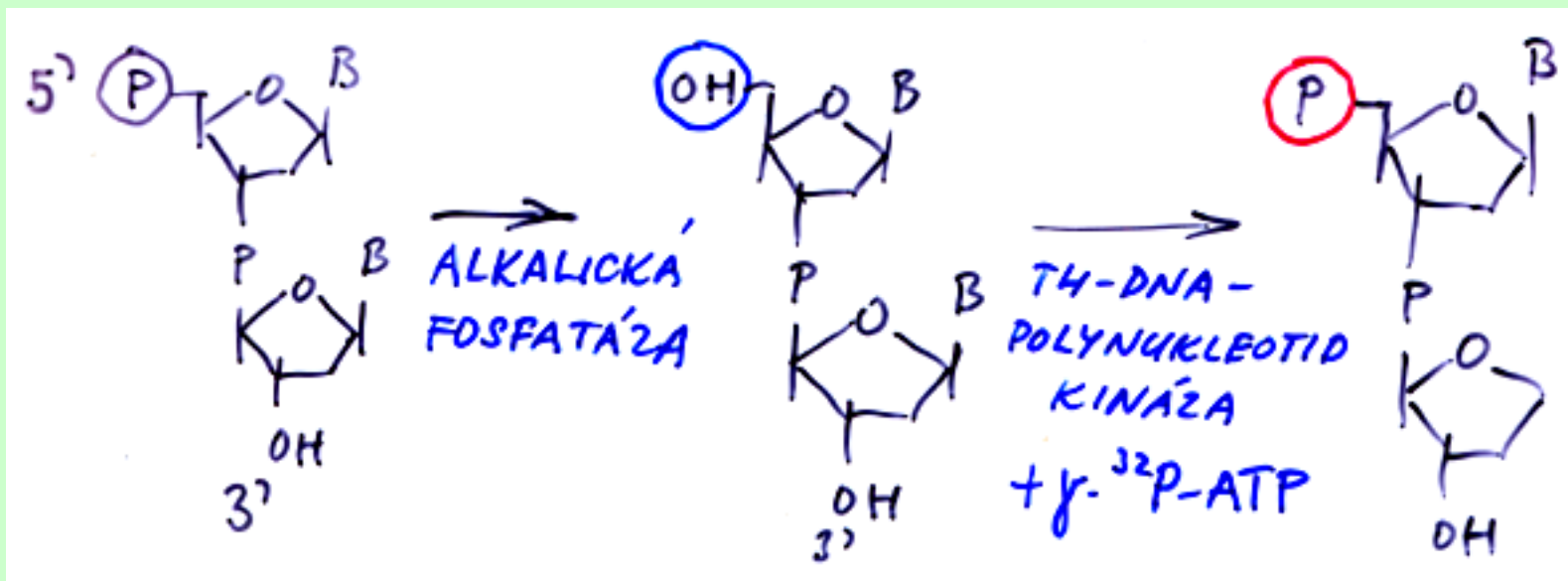
DNA polymeráza I odstraňuje
nukleotidy od místa zlomu
(exonukleázová aktivita 5'-
3')

Současně ve stejném směru
připojuje značené nukleotidy
k 3'konci zlomu



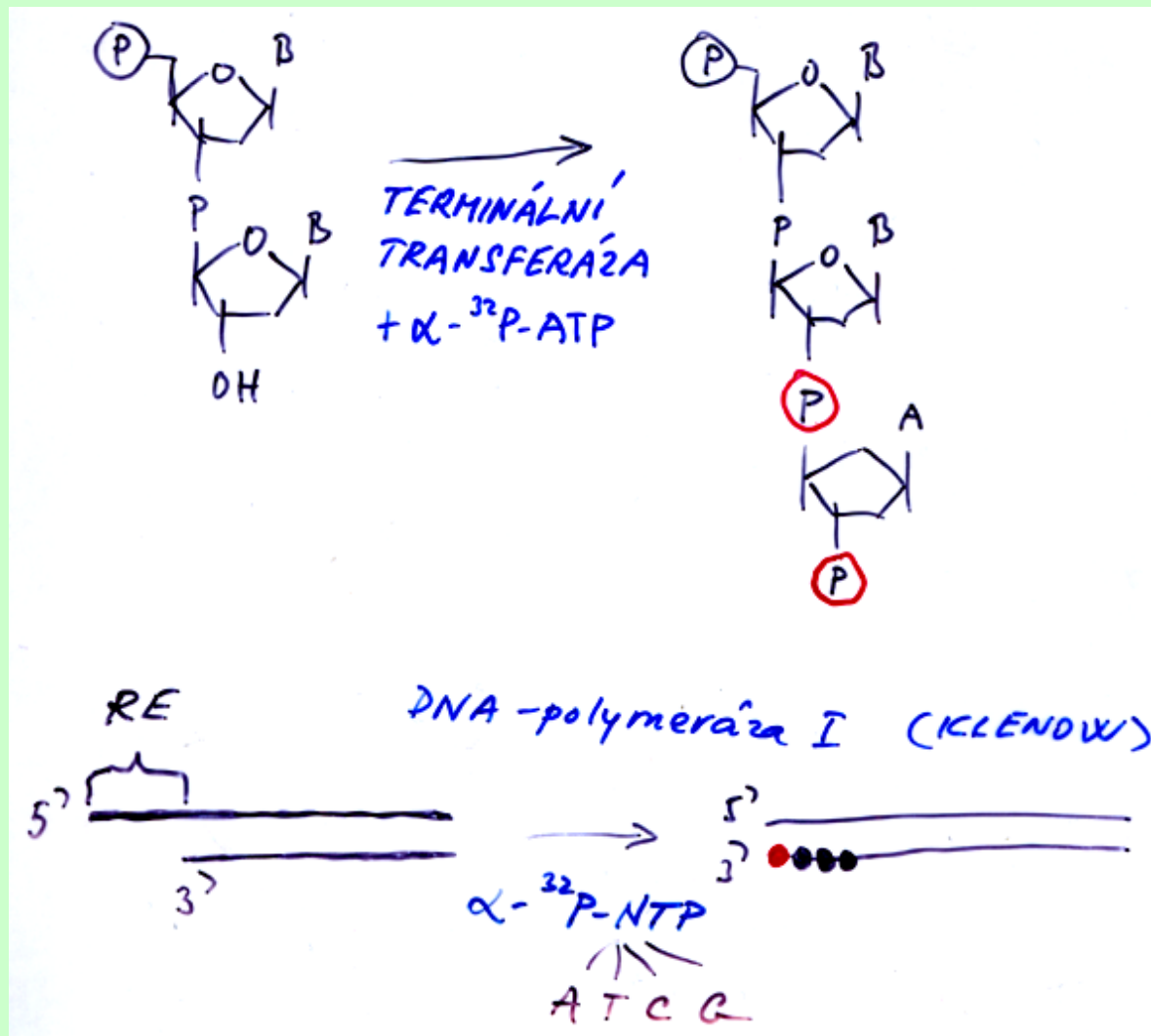
Značení konců DNA fragmentů

a) značení 5' konců



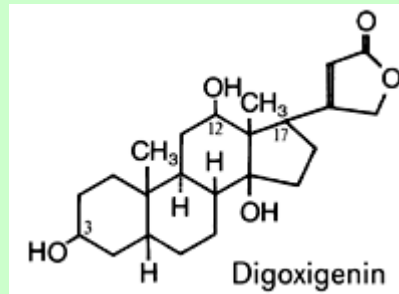
Značení konců DNA fragmentů

b) značení 3' konců

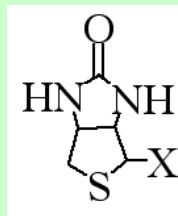


Neradioaktivní značení sond

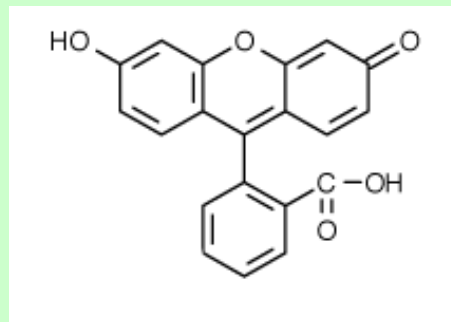
- Digoxineninem



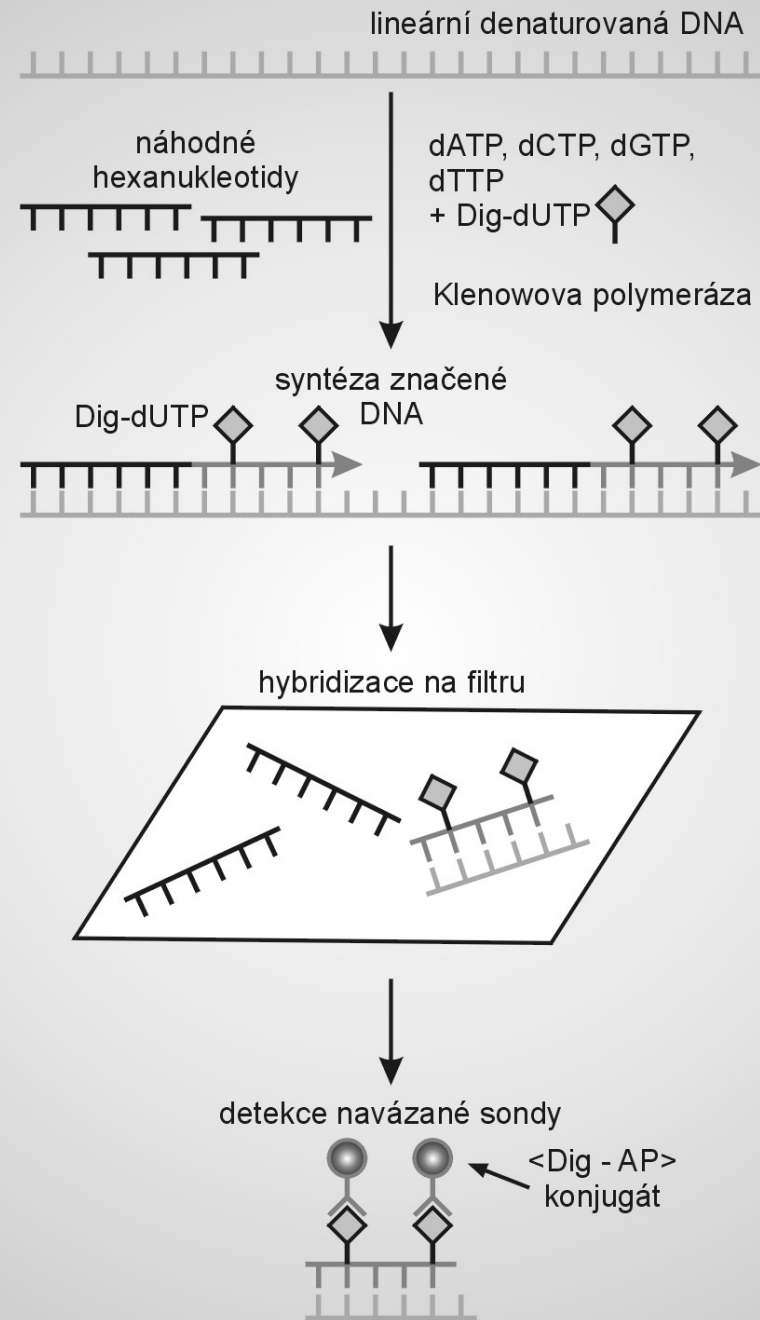
- Biotinem



- fluorescenčními značkami (fluorescein, rhodamin, kumarin)



Neradioaktivní značení nukleových kyselin digoxigeninem



Hybridizační postup

1. Prehybridizace - zabránění nespecifické vazbě sondy na membránu
2. Hybridizace - navázání sondy na komplementární sekvence (68°C, 42°C s formamidem)
 - lze volit různé podmínky hybridizace („stringence“)

Hybridizační postup

3. Promývání - odstranění nenavázané sondy
(účinnost je ovlivněna teplotou, koncentrací solí)

4. Detekce navázané sondy

- autografie

- imunologická reakce

- barvení

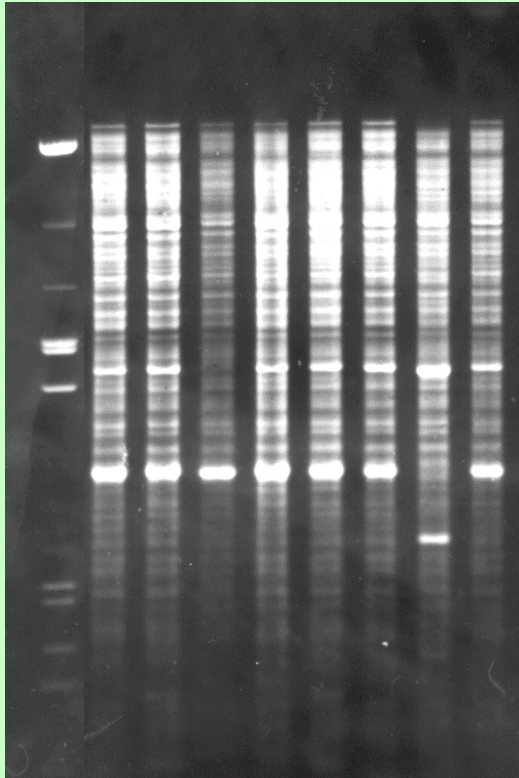
- luminiscence

-fluorescence

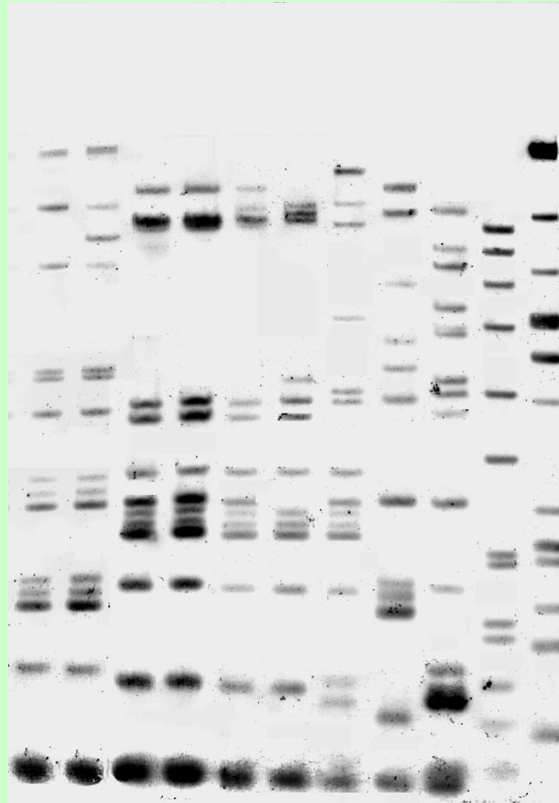
Hybridizační postup

5. Rehybridizace

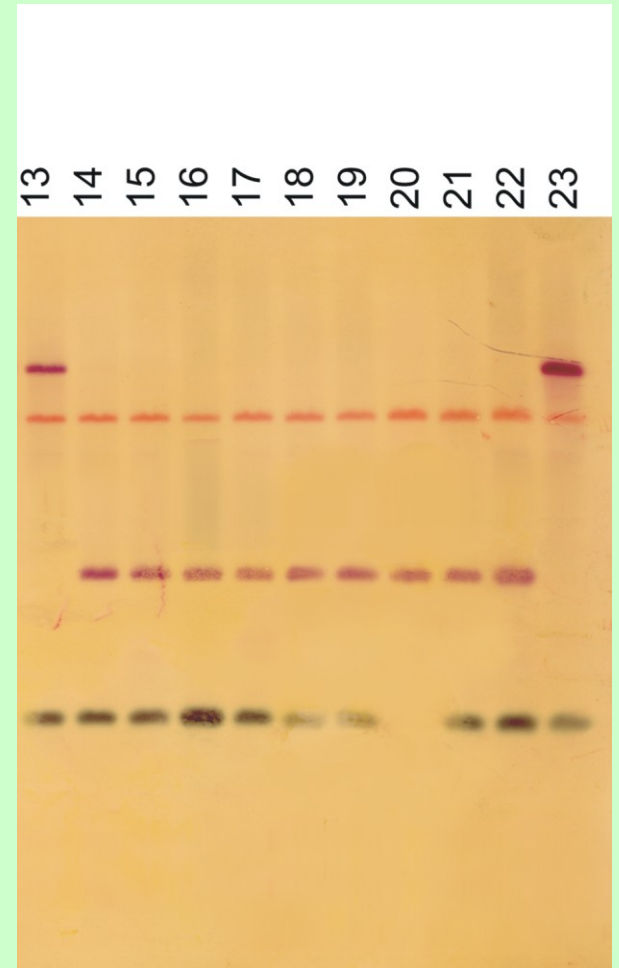
- odmytí navázané sondy
- aplikace další sondy



Elektroforetický gel



Hybridizace s radioaktivně značenou sondou



Hybridizace s neradioaktivně značenou sondou

Využití hybridizačních technik v praxi

Hybridizace *in situ*

Detekce DNA nebo RNA v intaktních buňkách radioaktivními nebo fluorescenčními sondami.

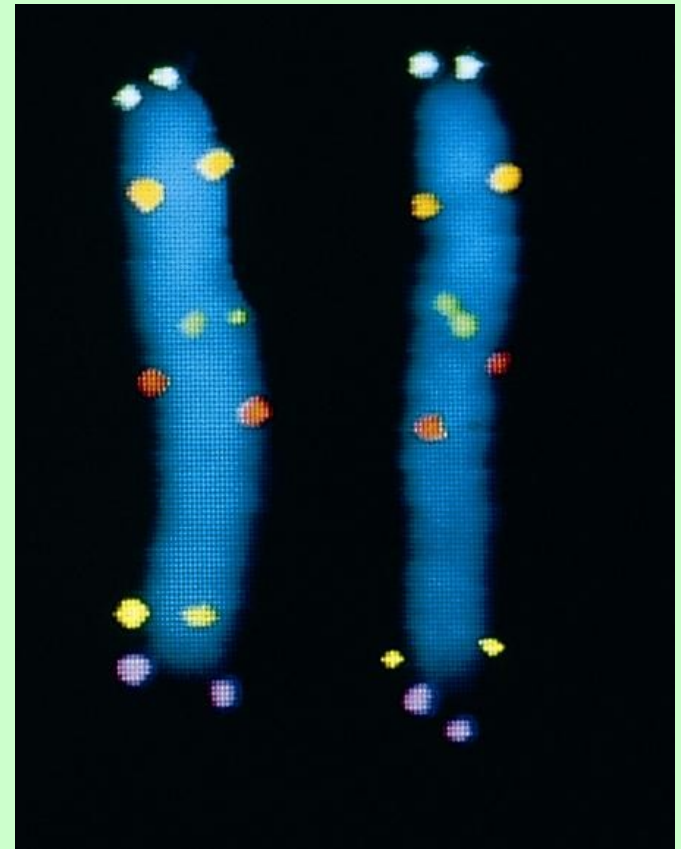
Využití:

- prostorová lokalizace nukleových kyselin v buňkách a tkáních (hybridizace buněčné RNA)
- lokalizace genů (sekvencí) na chromozómech (hybridizace jaderné DNA)

Použití hybridizace *in situ* pro detekci genů na chromosomech

Použito 6 různých sond pro analýzu sekvencí v lidském metafázním chromozomu 5.

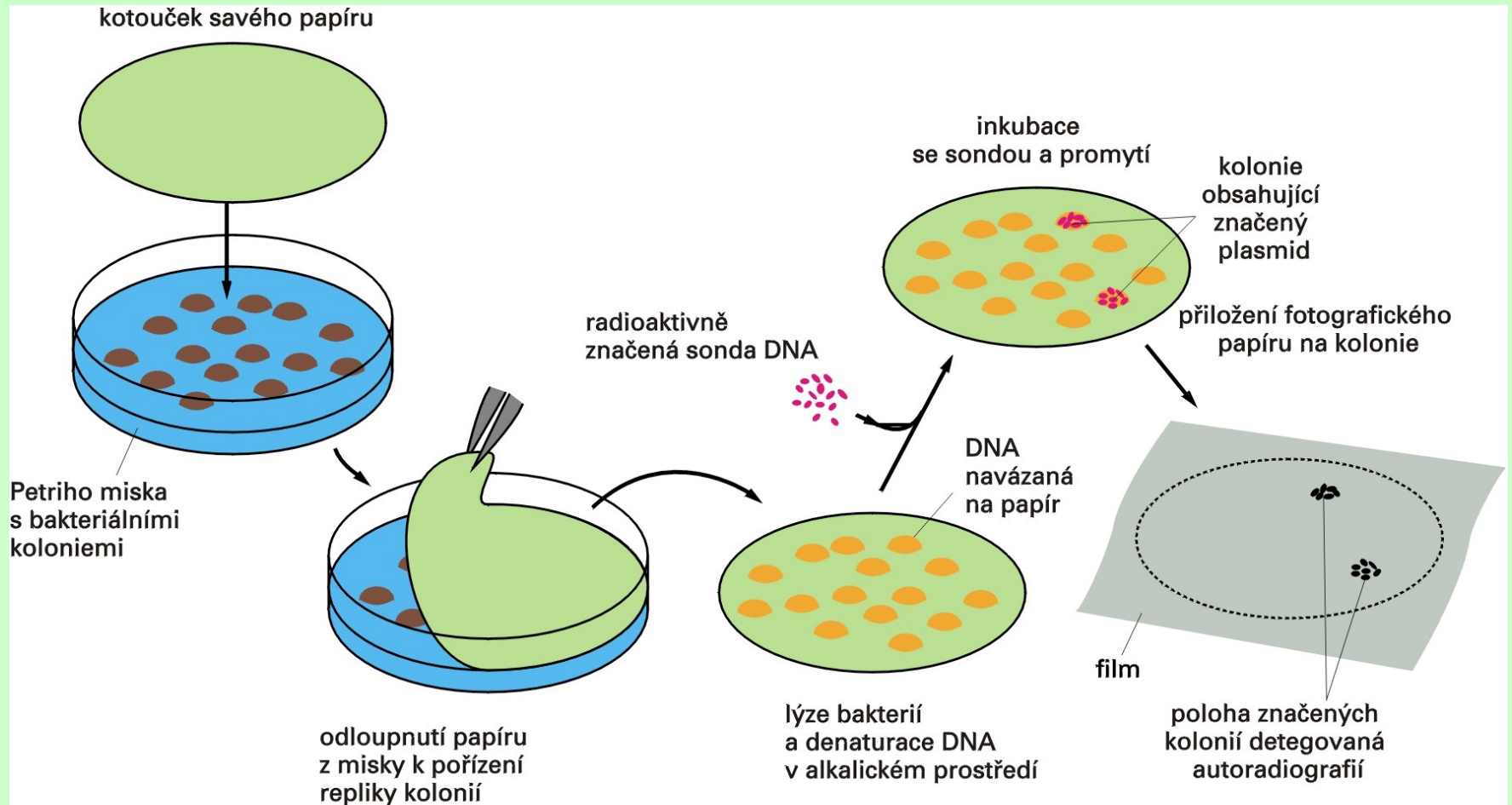
Každá sonda vytváří 2 tečky na každém chromozomu (mitózou je DNA zreplikována).



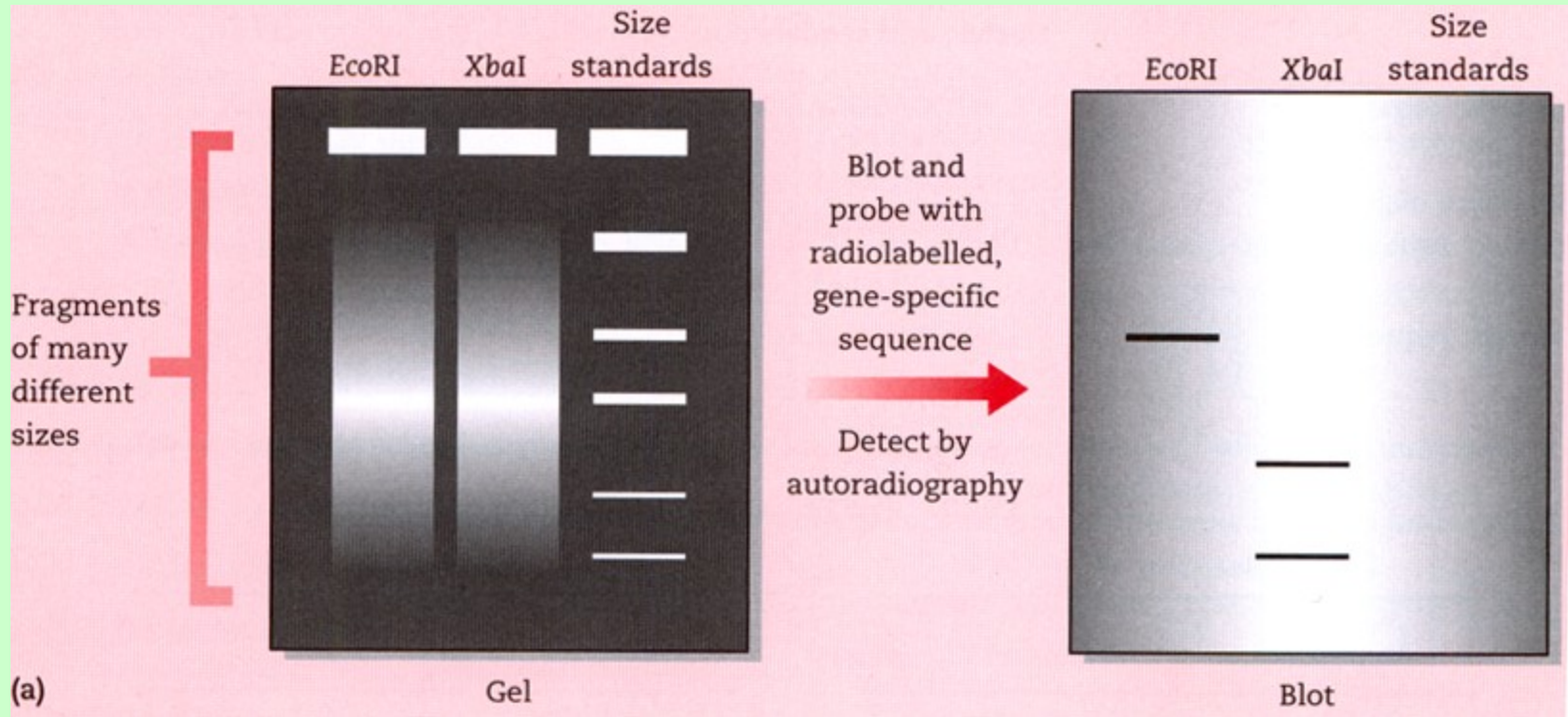
Obvyklá fluorescenční barviva

- fluorescein (zelená fluorescence)
- rhodamin (červená fluorescence)
- kumarin (modrá fluorescence)

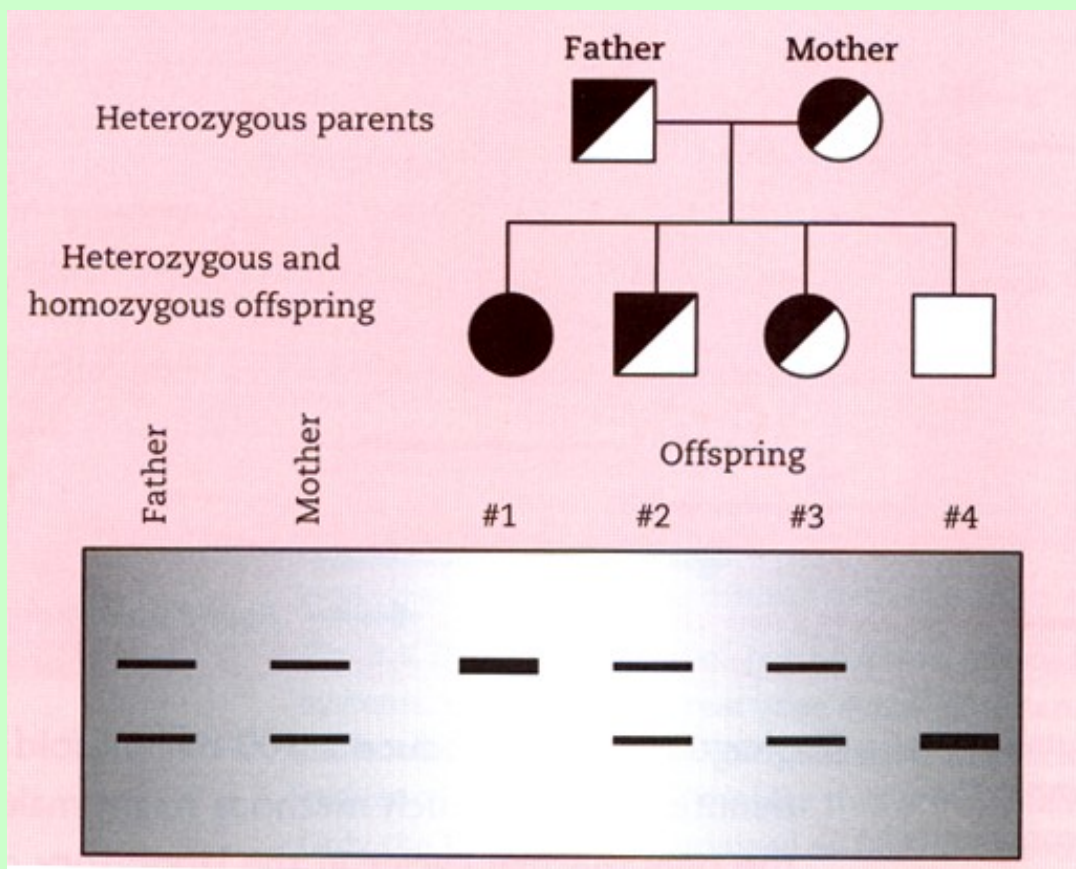
Detekce bakteriálního klonu nesoucího určitý fragment DNA



Lokalizace specifických sekvencí v genomové DNA

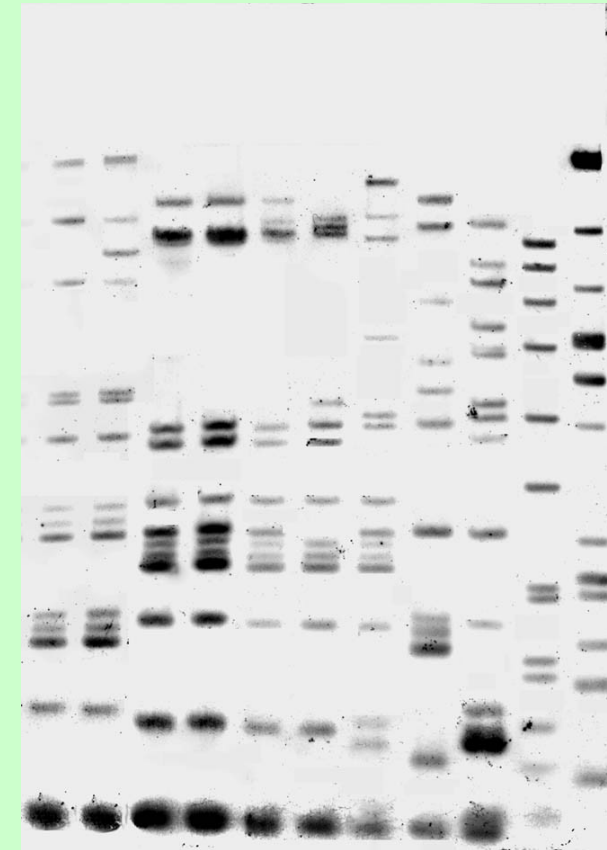
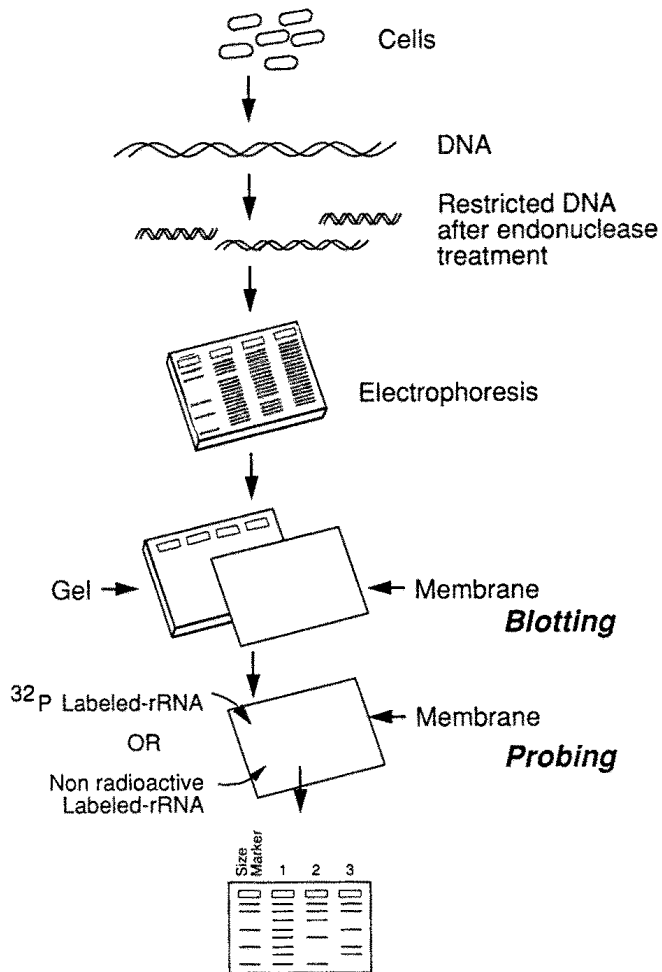


Southernova analýza potomků heterozygotních rodičů (RFLP)



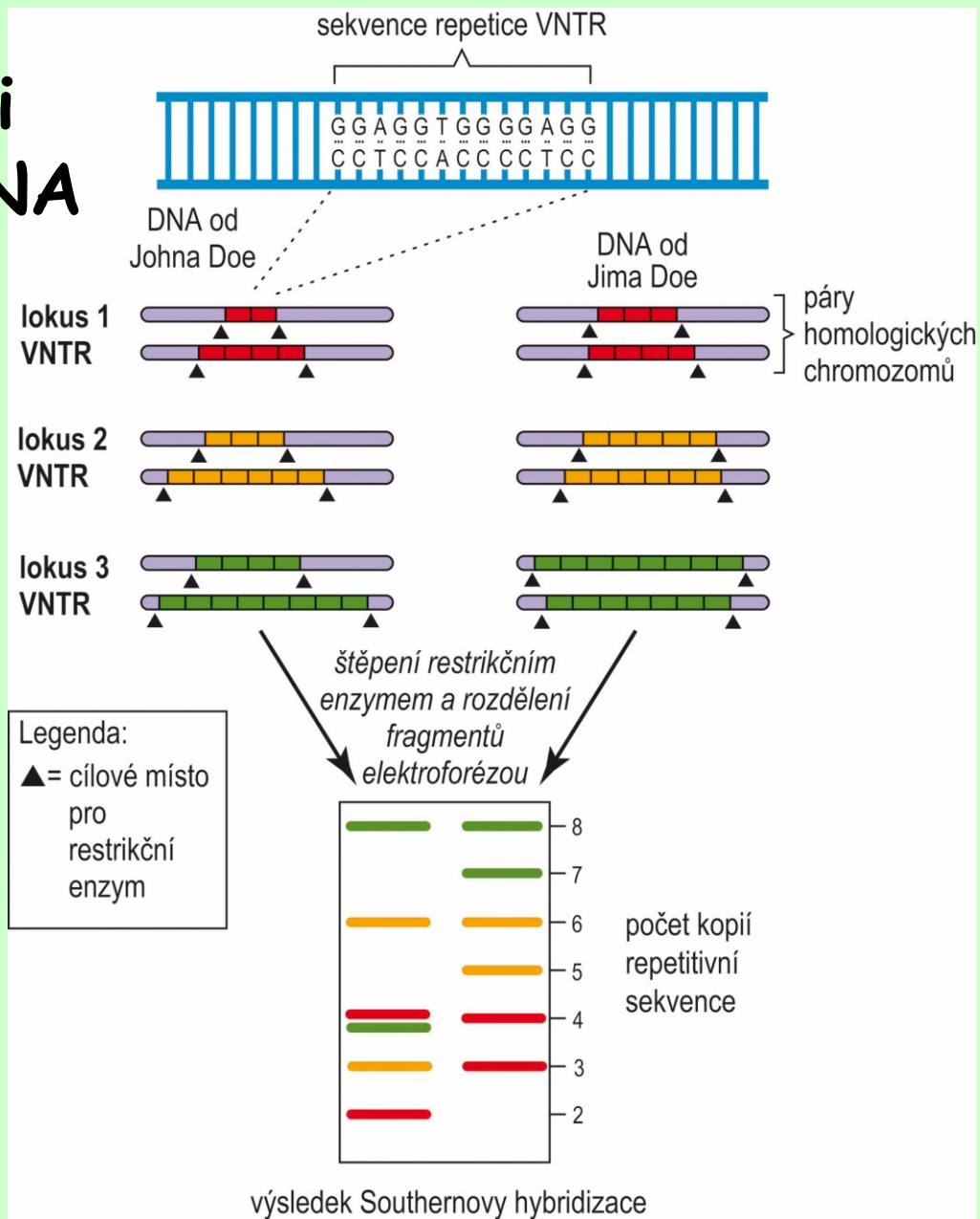
Pokud je výskyt většího fragmentu spojen s nemocí je třeba sledovat dceru #1, sourozenci #2 a 3 jsou přenašeči

Ribotypizace bakterií



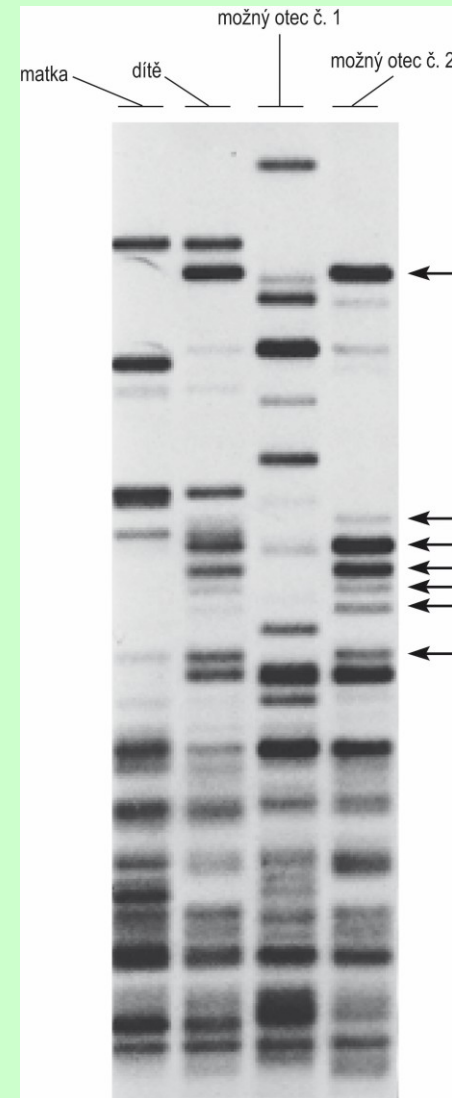
Příklad hybridizace se sondou specifickou pro 16S rDNA.

Využití VNTR při přípravě profilu DNA



Využití VNTR při testování otcovství

- izolace DNA z buněk otce, matky a dítěte
- štěpení DNA, elektroforéza, Southernův přenos
- všechny pruhy v zobrazení profilu DNA dítěte by měly být přítomny v kombinaci profilů jeho rodičů
- lze použít více sond

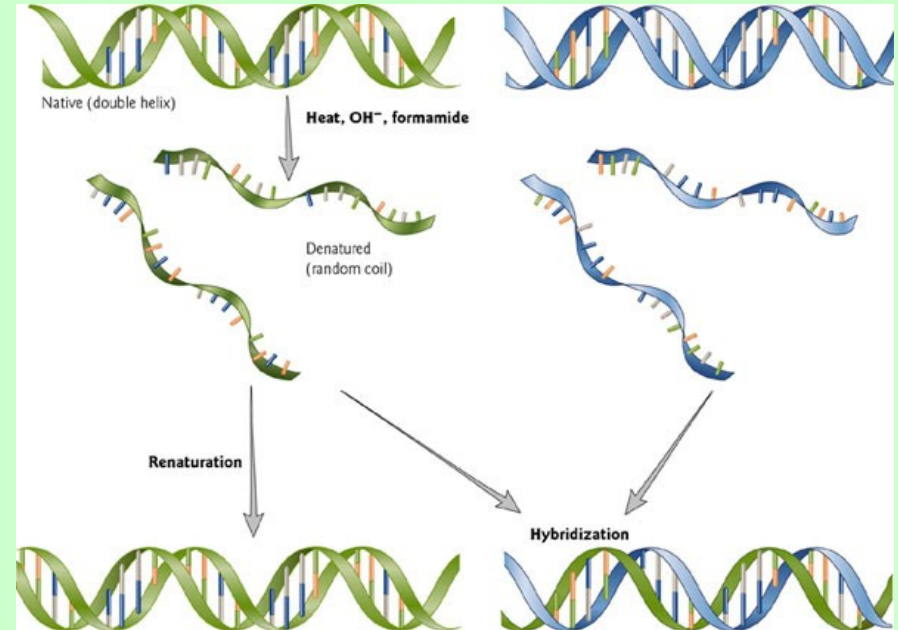


Testování podobnosti DNA

- na základě hybridizace DNA-DNA
 - studium příbuznosti organismů
 - základ pro studium jejich evoluce
 - tvorbu fylogenetických stromů

Postup:

- štěpení DNA na malé fragmenty a jejich separace (denaturace)
- smísení denaturovaných DNA ze srovnávaných vzorků



- renaturace méně příbuzných řetězců nebude perfektní, stabilita hybridů bude odpovídat míře komplementarity řetězců - lze prověřit podle míry energie nutné pro jejich opětovou separaci

- DNA hybridy příbuzných řetězců budou denaturovat při vyšších teplotách