

# Hybridizace nukleových kyselin

Tvorba dvouřetězcových hybridů za dvou jednořetězcových a komplementárních molekul

Založena na schopnosti denaturace a renaturace DNA.

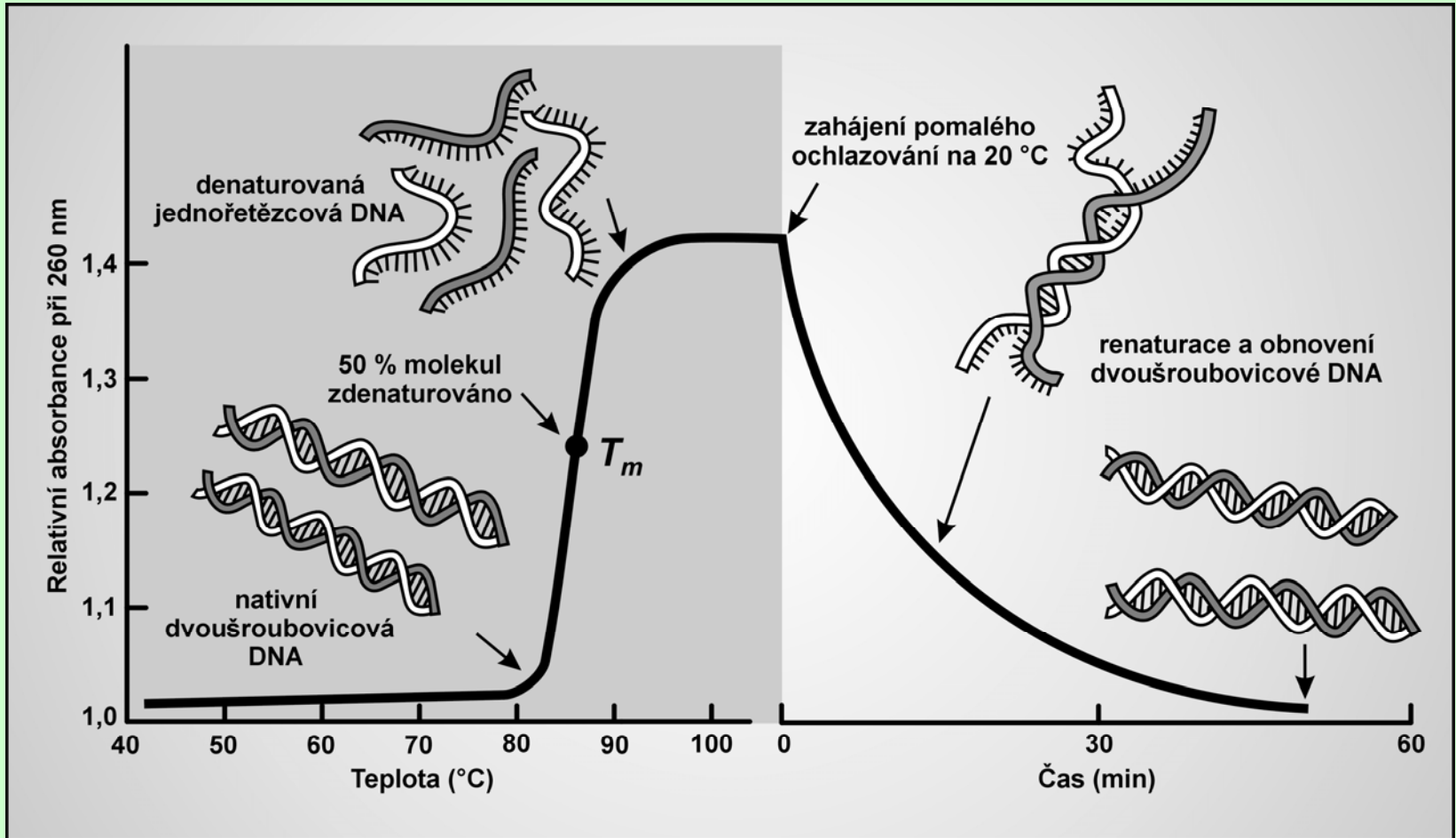
# Denaturace DNA

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

# 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

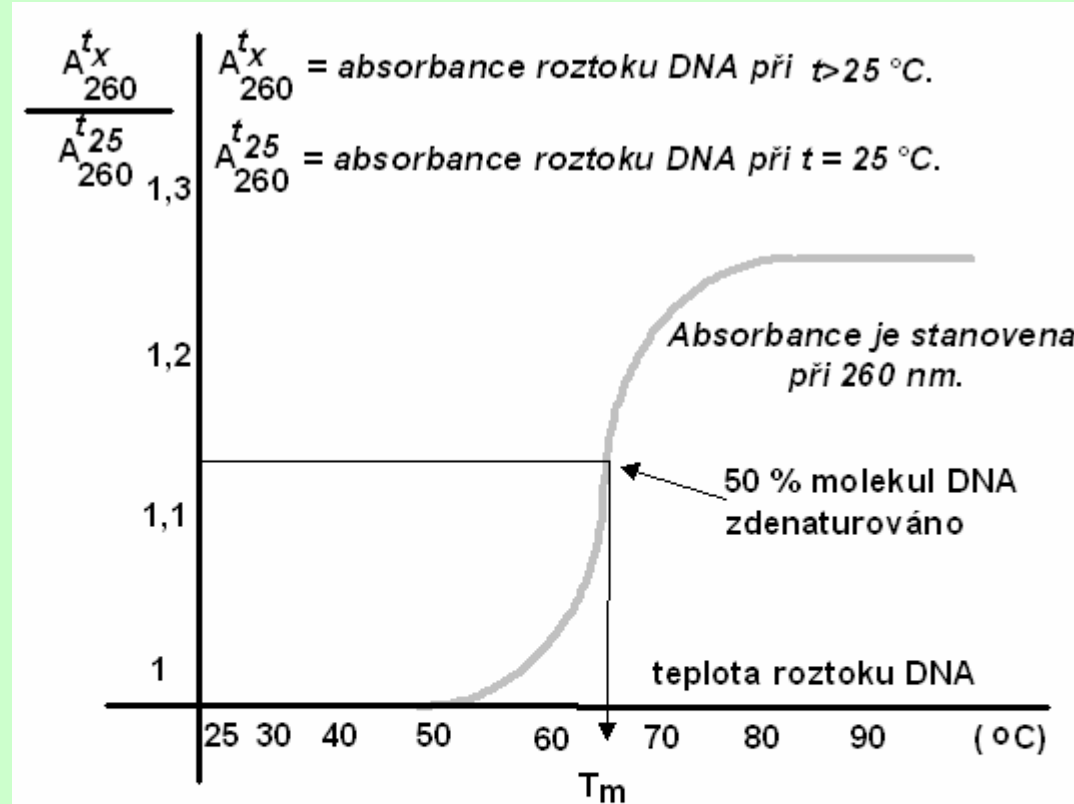
# Denaturace a renaturace (hybridizace) DNA



# 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. Denaturaci 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

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

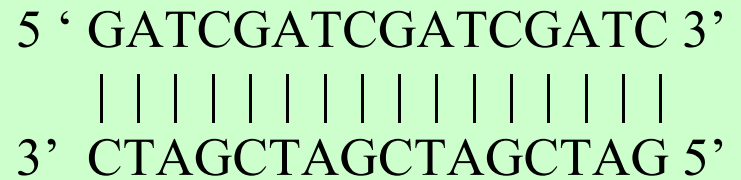
## Hybridizace molekul nukleových

**kyselin.** Spojení částečně nebo úplně komplementárních DNA řetězců pocházejících z různých dvouřetězcových molekul DNA nebo podobně spojení DNA-řetězce s RNA řetězcem; oba procesy probíhají *in vivo* a mohou být navozeny *in vitro*.

**Hybridní molekuly DNA.** Renaturované molekuly, v nichž se spojily řetězce pocházející z molekul DNA různých zdrojů.

**Homoduplex.** Hybridní molekula DNA, jejíž řetězce se vyznačují úplnou komplementaritou.

**Heteroduplex.** Hybridní molekula DNA, jejíž řetězce se vyznačují neúplnou komplementaritou.



zvýšení teploty



+ přidání



ochlazení



# Faktory ovlivňující tvorbu hybridů

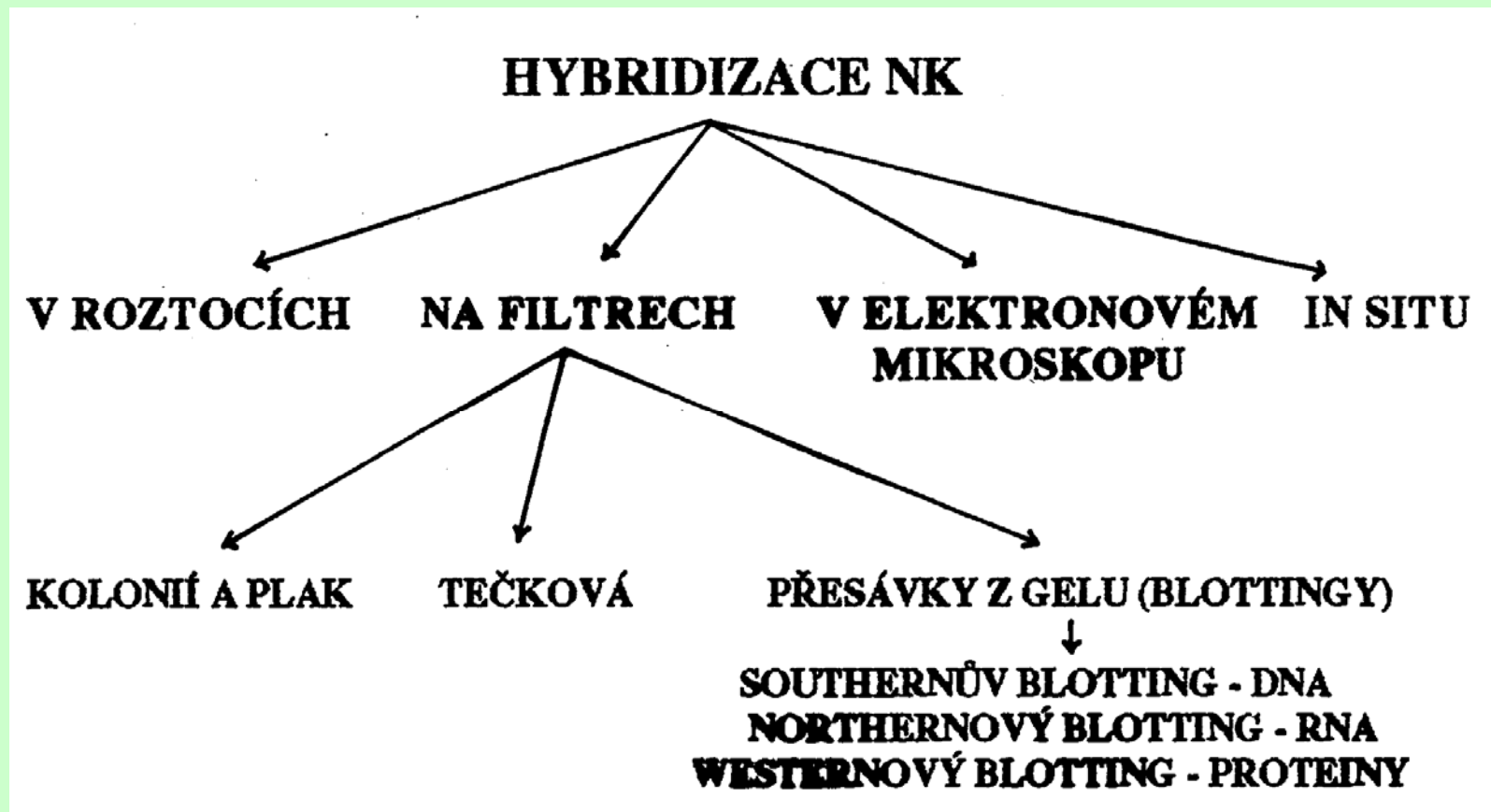
- teplota
- koncentrace solí
- stupeň komplementarity
- délka fragmentů

# Využití hybridizace nukleových kyselin

- test komplementarity sekvencí (ve směsi mnoha molekul DNA budou hybridizovat jen ty, které jsou dostatečně komplementární)
- detekce molekul DNA a RNA, které jsou komplementární k jakékoliv izolované nukleové kyselině
- základem hybridizace je vždy značená sonda o známé nukleotidové sekvenci



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



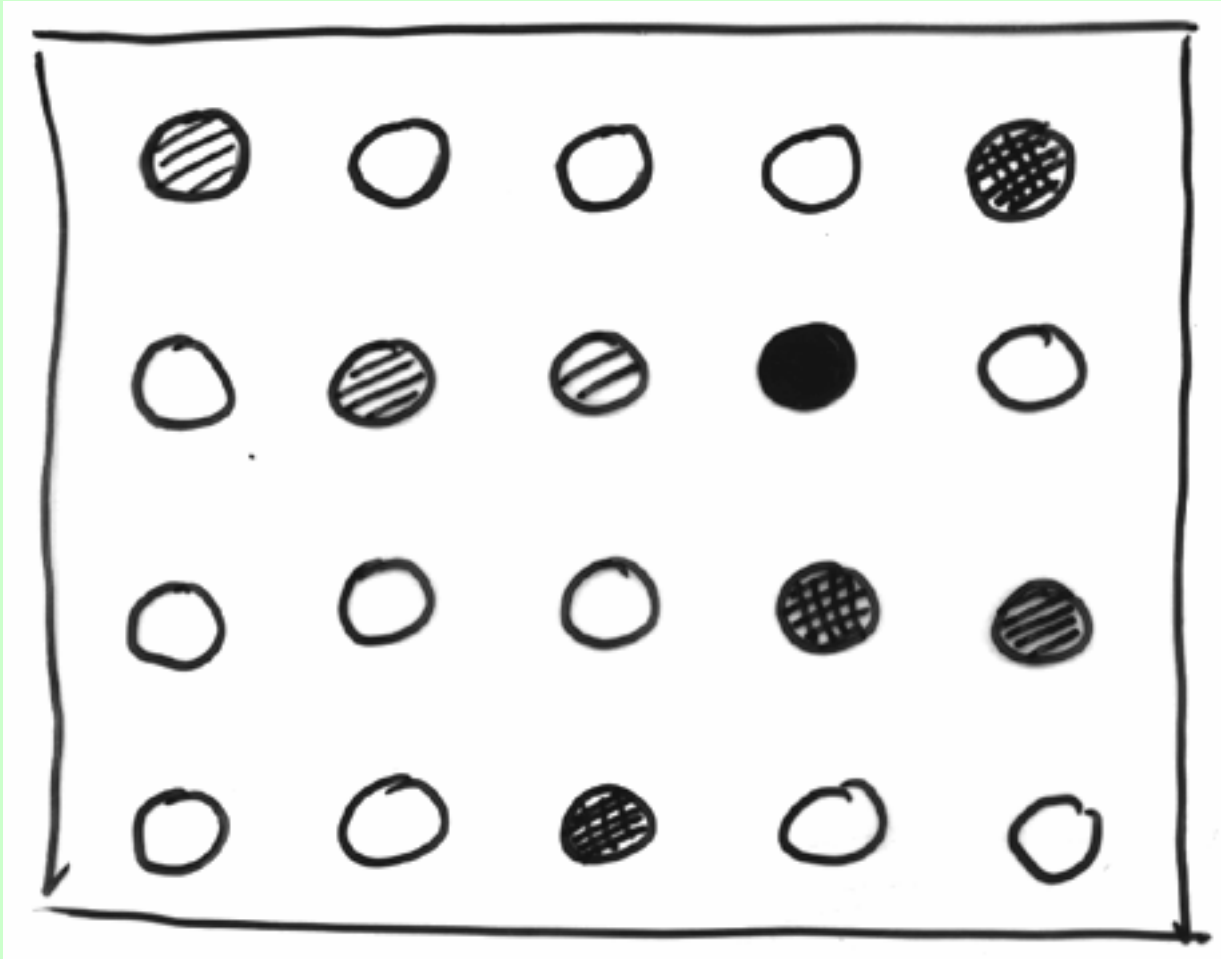
# Typy přenosu z gelu na membránu podle typu analyzovaných molekul

- 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)

# Tečková hybridizace („dot blot“)

## Postup:

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

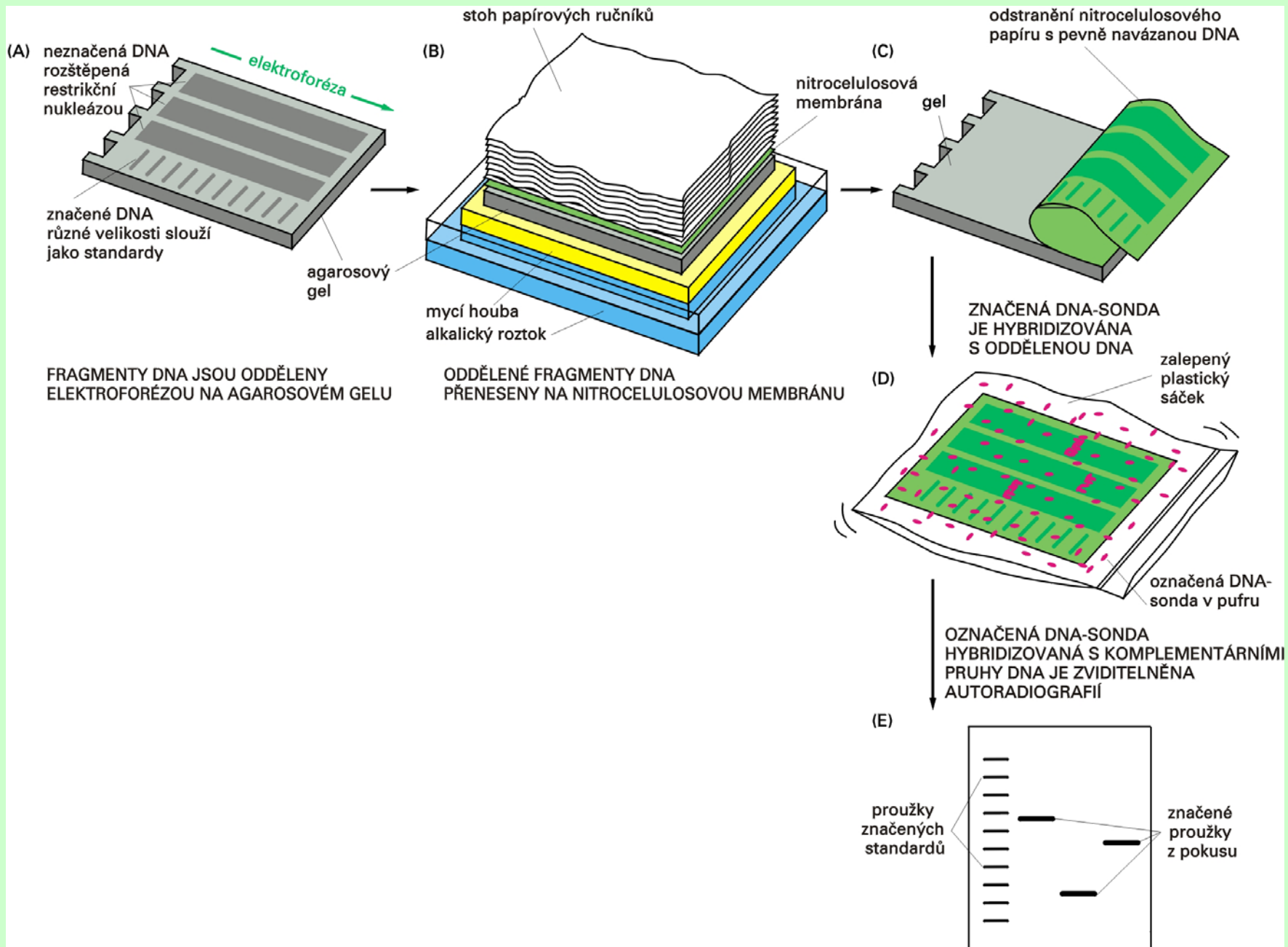


## Typický hybridizační experiment - Southernův přenos (blot, přesávka)

- technika vyvinuta E.M. Southernem (1975)
- 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 restričních 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)



# Typy sond

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

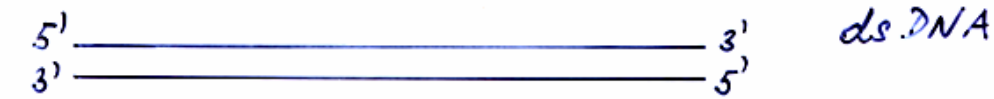


## Způsoby značení sond

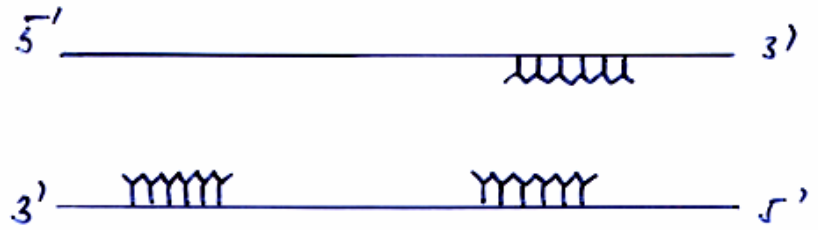
- pomocí náhodných hexanukleotidů („random primer DNA labeling“)
- posunem jednořetězcového zlomu („nick translation“)
- koncové značení
- značení vektoru s naklonovanou sondou
- značení transkriptů *in vitro* (RNA)

**Značení DNA pomocí  
náhodných oligonukleotidů**

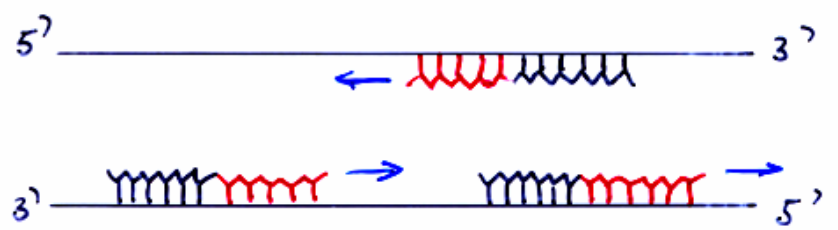
**„Random primer DNA labeling“**



denaturace  
připojení náhodných  
hexanukleotidů



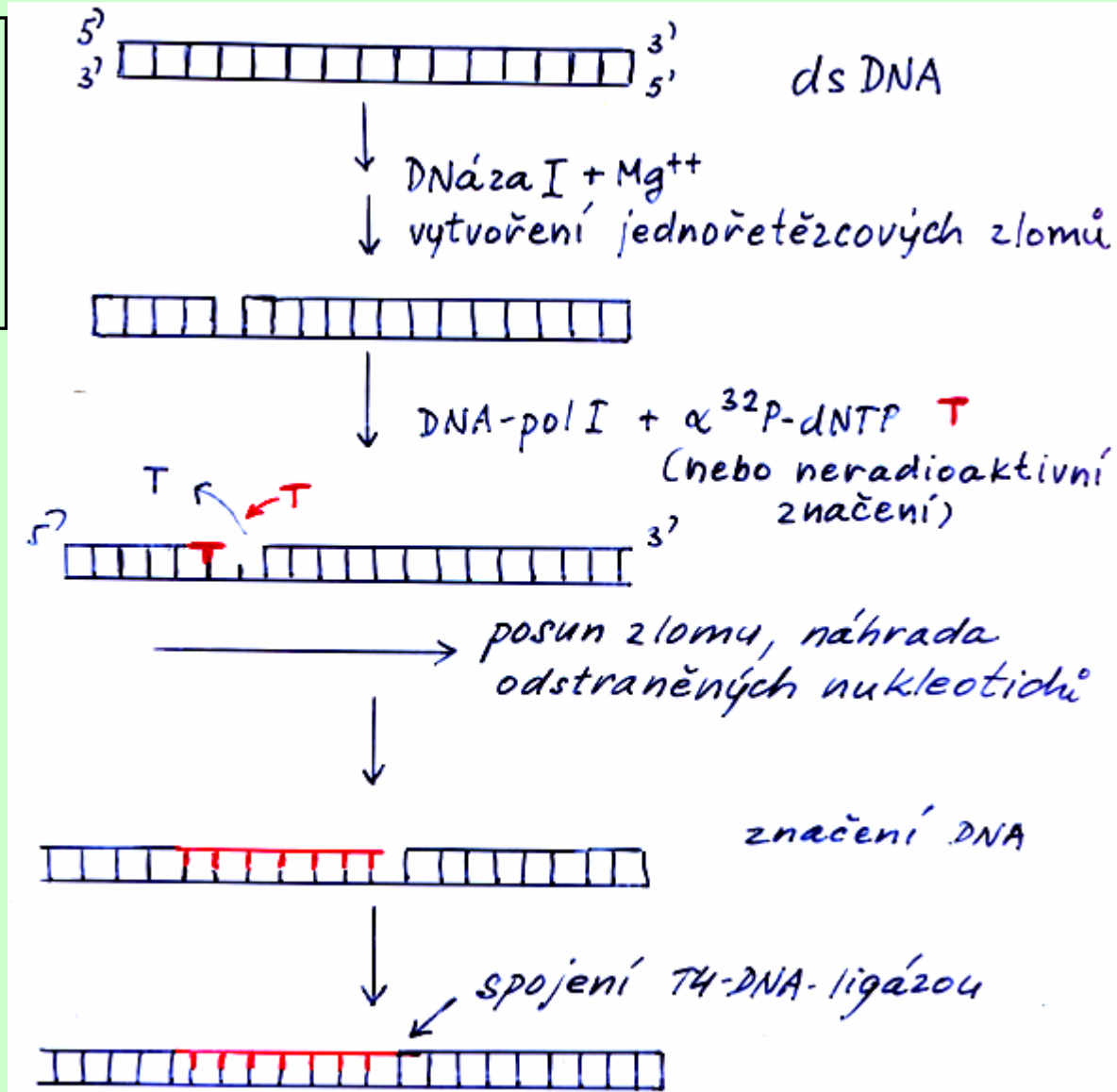
Klenowova polymeráza  
+  $\alpha^{32}\text{P}$ -dNTP



využití naznačené DNA jako  
hybridizačních sond

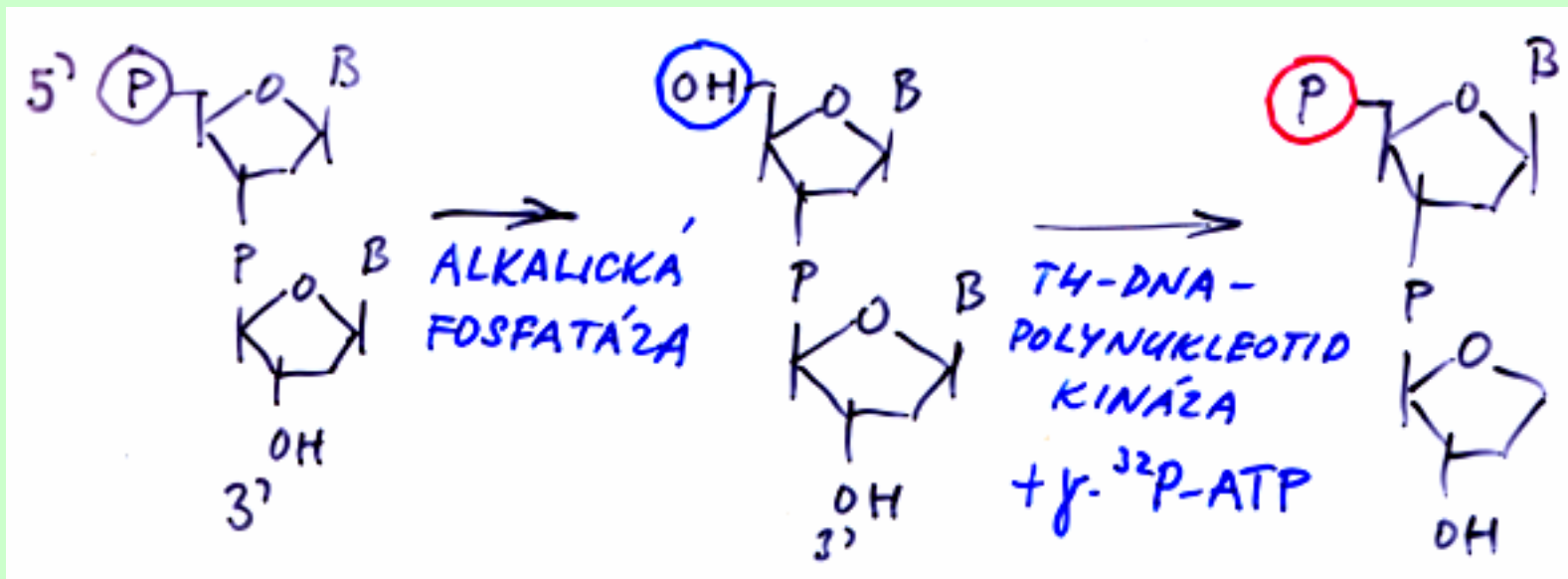
# Značení DNA posunem jednořetězcového zlomu

„Nick translation“



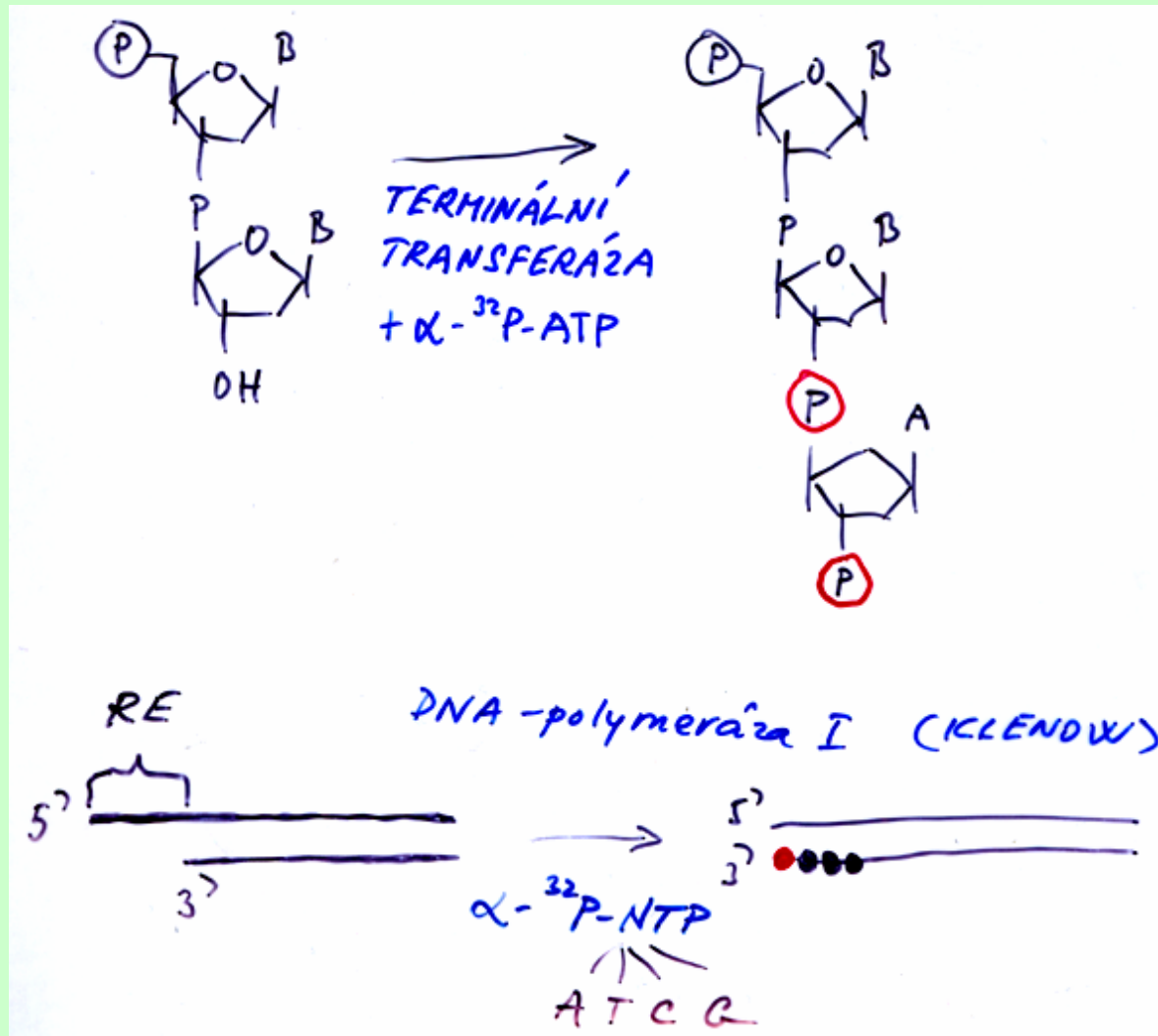
# Značení konců DNA fragmentů

a) značení 5' konců



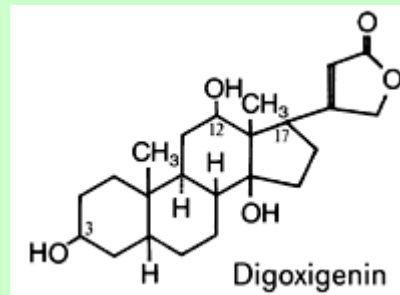
# Značení konců DNA fragmentů

b) značení 3' konců

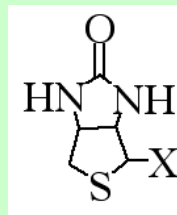


# Neradioaktivní značení sond

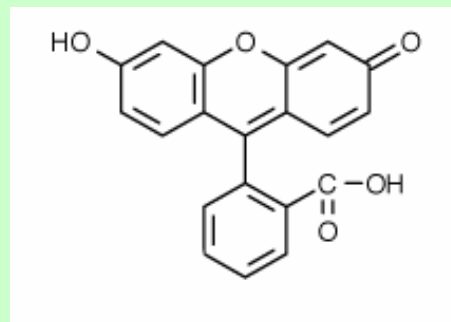
- Digoxineninem



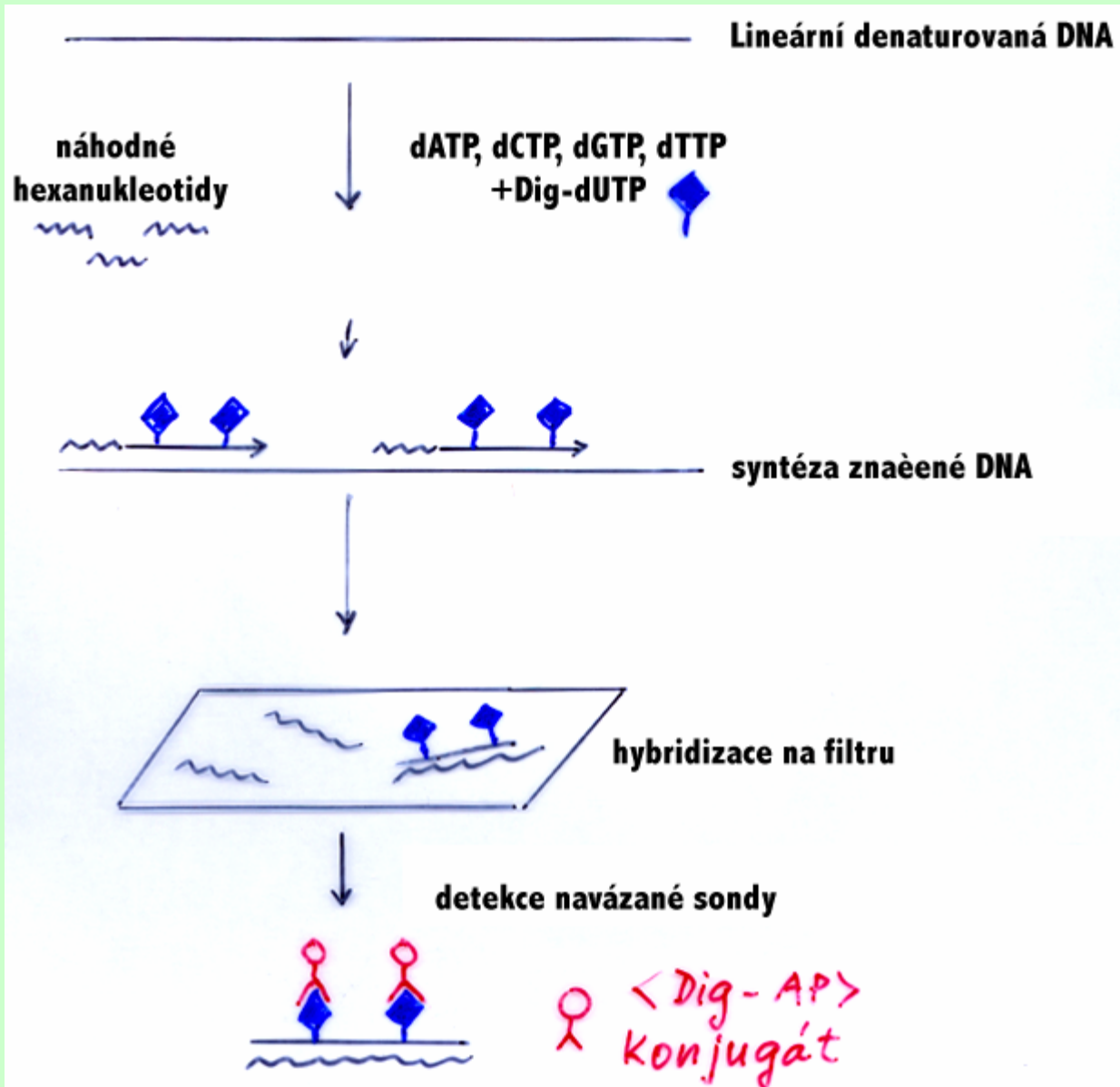
- Biotinem



- fluorescenčními značkami (fluorescein, rhodamin, kumarin)



# Detekce neradioaktivně značených nukleových kyselin digoxigeninem

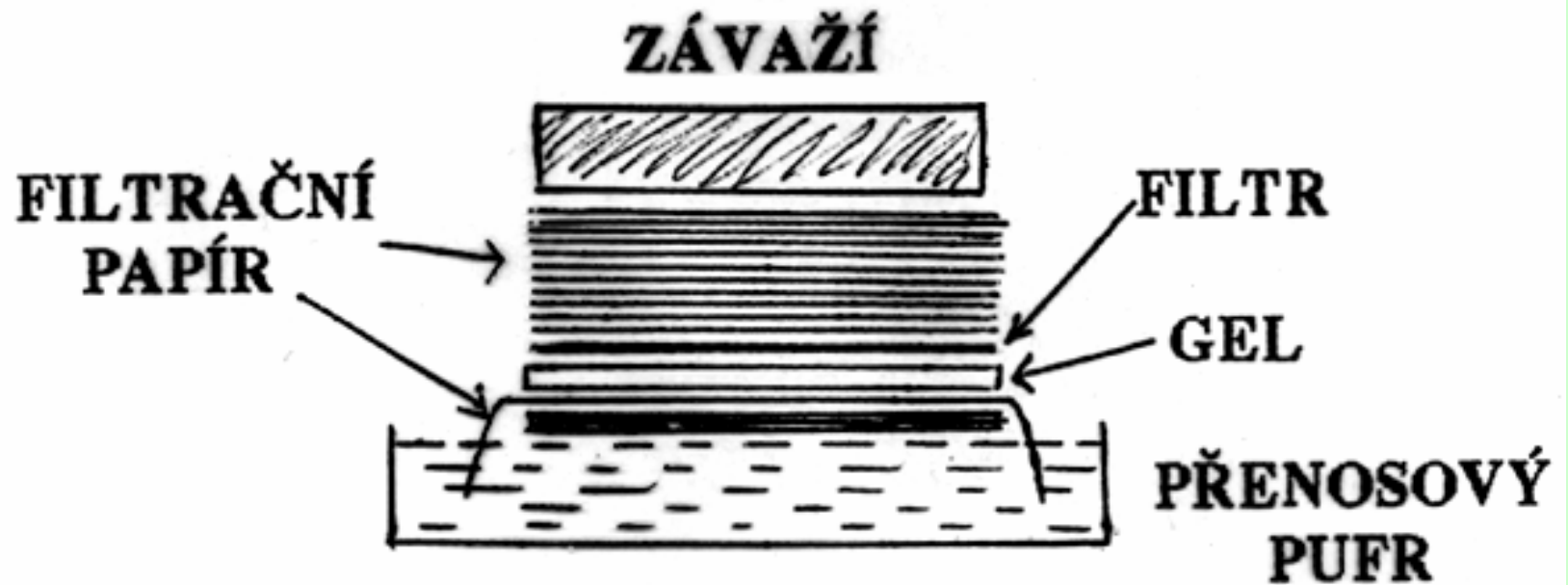


## Způsoby přesávky („blotingu“)

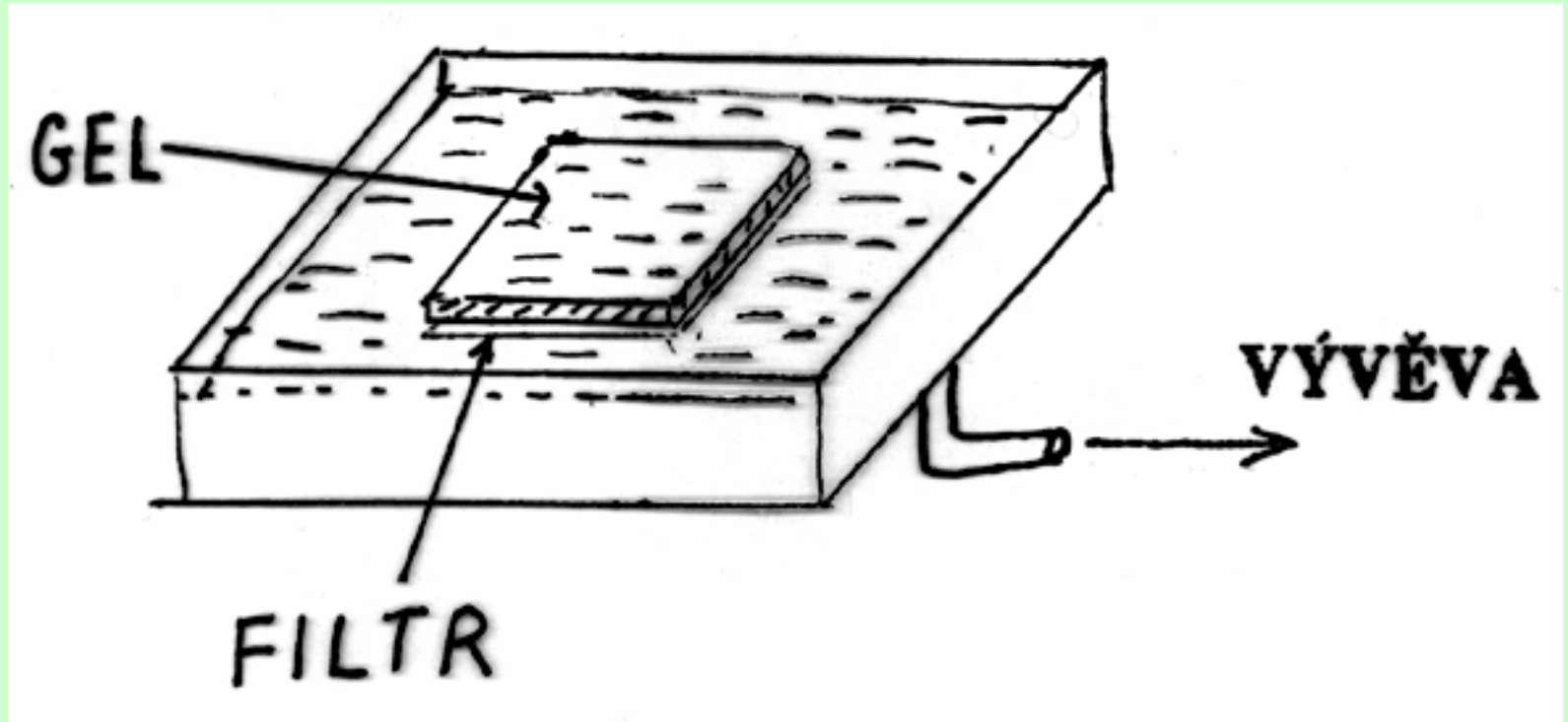
- kapilární přenos
- elektroforetický přenos
- vakuový přenos



# Kapilární přenos



# Vakuový přenos



# Hybridizační postup

1. Prehybridizace - zabránění nespecifické vazbě sondy na membránu (Denhardtův roztok, BLOTTO, heparin, heterologní DNA, mléčné proteiny – blokovací reagent)
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

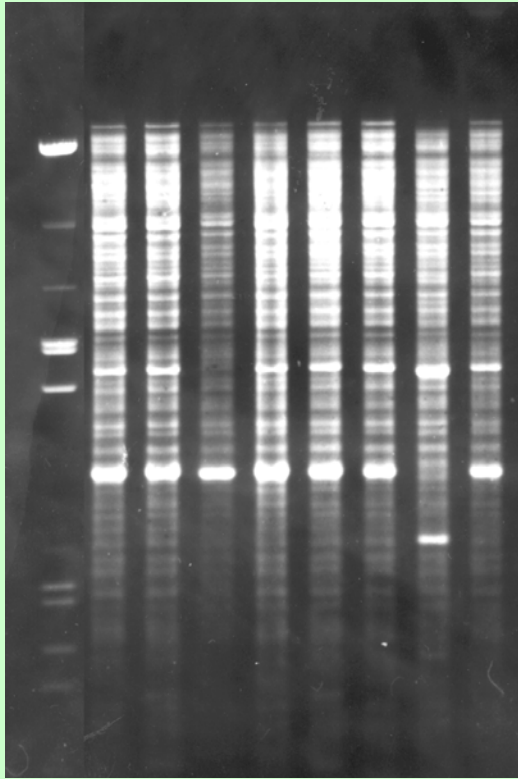
- luminiscence

-fluorescence

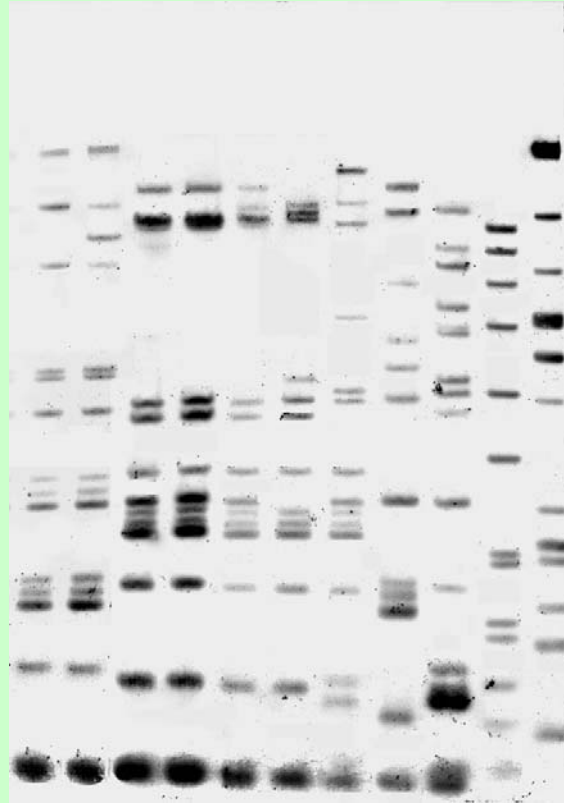
# Hybridizační postup

## 5. Rehybridizace

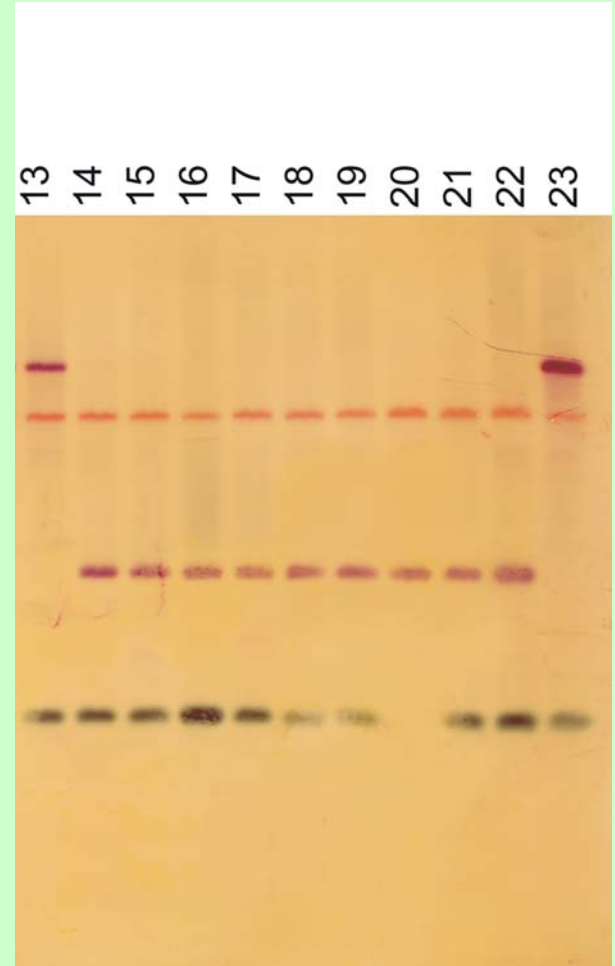
- odmytí navázané sondy
- aplikace další sondy



Elektroforetický gel



Hybridizace s radioaktivně značenou sondou



Hybridizace s neradioaktivně značenými sondami