

Metódy identifikácie mutácií: PCR – RFLP, AS – PCR, RT – PCR

PCR – Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction)

PCR je metóda, ktorá umožňuje zrnženie (amplifikáciu) špecifických úsekov DNA *in vitro* polymerizáciou pri využití katalytického účinku špecifického enzýmu DNA-polymerázy. Zrnženie DNA sa realizuje cyklickým opakovaním celého procesu (preto označenie reťazová reakcia). PCR takto imituje prirodzený mechanizmus replikácie DNA, ktorý sa v organizme uskutočňuje počas každého cyklu delenia bunky.

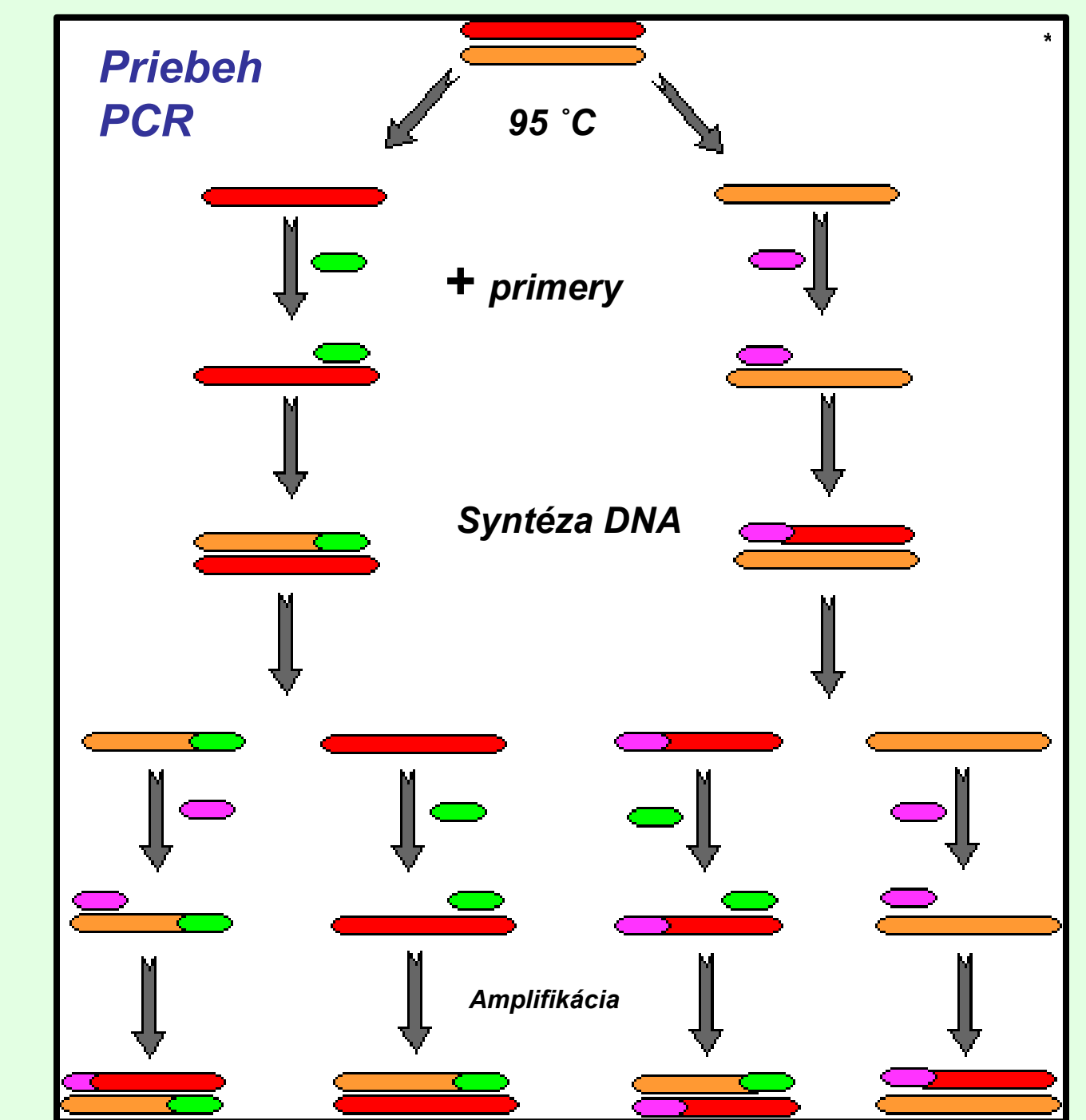
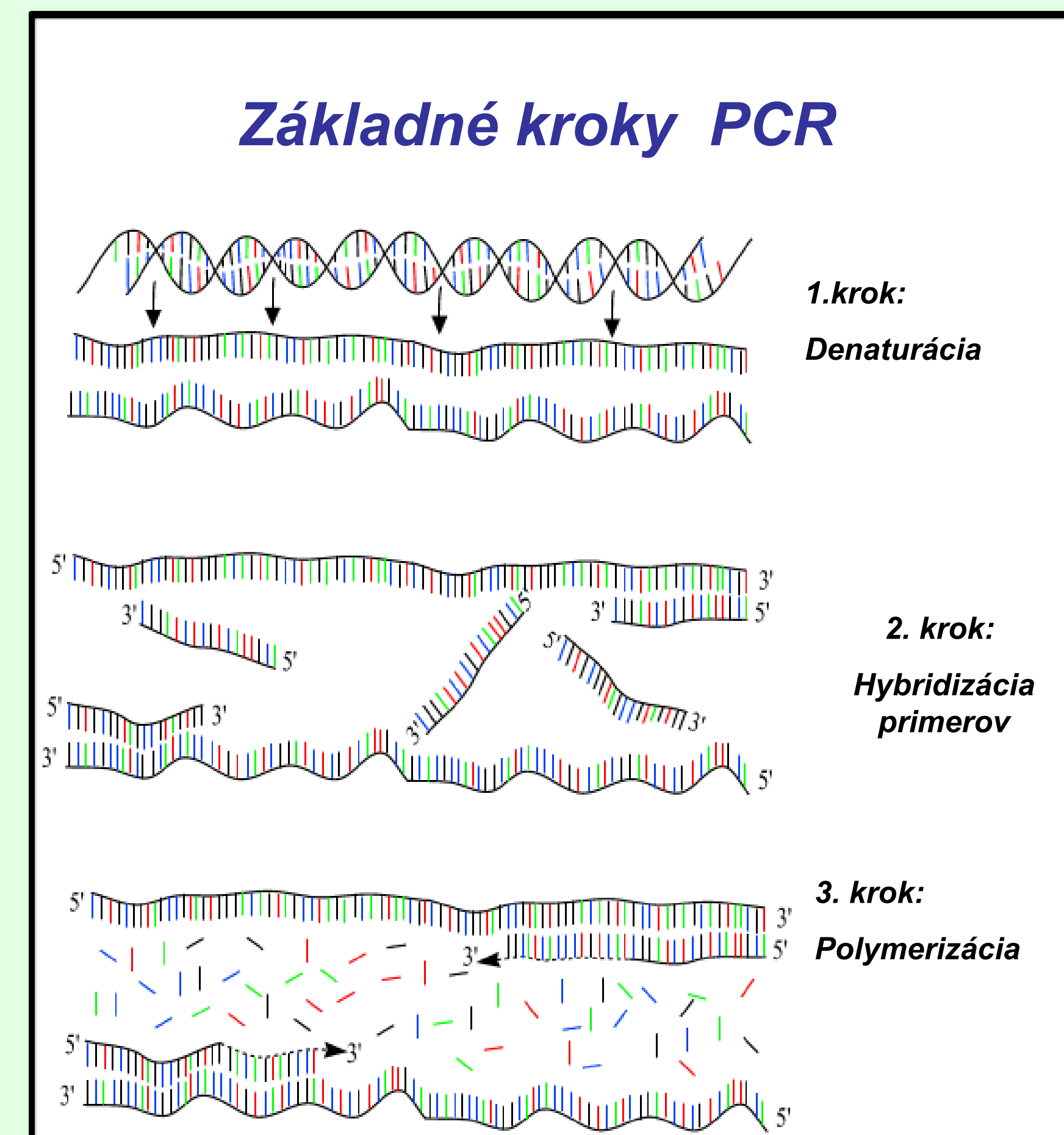
Takto možno v priebehu pár hodín získať až niekoľkomiliónové zrnženie akéhokol'vek úseku DNA, ktorého sekvencia (aspoň oboch koncových oblastí) je známa a ktorého dĺžka nepresahuje 20kb. Táto metóda spôsobila v molekulárnej genetike revolúciu, pretože je geniálne jednoduchá, veľmi rýchla a citlivá. Po prvýkrát referovali o tejto metóde Mullis a Faloona FA (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

Princíp DNA amplifikácie spočíva v cyklickom opakovaní troch krokov:

Denaturácia – oddelenie obidvoch komplementárnych reťazcov daného úseku DNA zohriatím na 94 °C

Hybridizácia – naviazanie dvoch komplementárnych primerov (štartéry - oligonukleotidy 18-25bp ohraničujúce amplifikovaný úsek DNA) po jednom na 3' koniec oboch reťazcov úseku, ktorý má byť amplifikovaný; hybridizácia prebieha pri teplote 50-60 °C

Polymerizácia – syntéza chýbajúceho komplementárneho úseku DNA – jej začiatok predstavujú primery, od ktorých sa vlastná syntéza odvíja pripájaním jednotlivých komplementárnych nukleotidov: prekuzory DNA (4-deoxynukleozidtrifosfáty dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ktoré predstavujú základné kamene pre syntézu DNA. Je to úloha termostabilnej DNA-polymerázy, ktorá sama však nemá schopnosť iniciovať syntézu (na to slúžia primery). Syntéza prebieha pri optimálnej teplote 72 °C. Po skončení syntézy je vytvorená kompletná kópia pôvodného dvojvláknového úseku DNA, ohraničeného primermi. Zrnženie sa uskutočňuje exponenciálnym radom (2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256... 1 073 741 824).

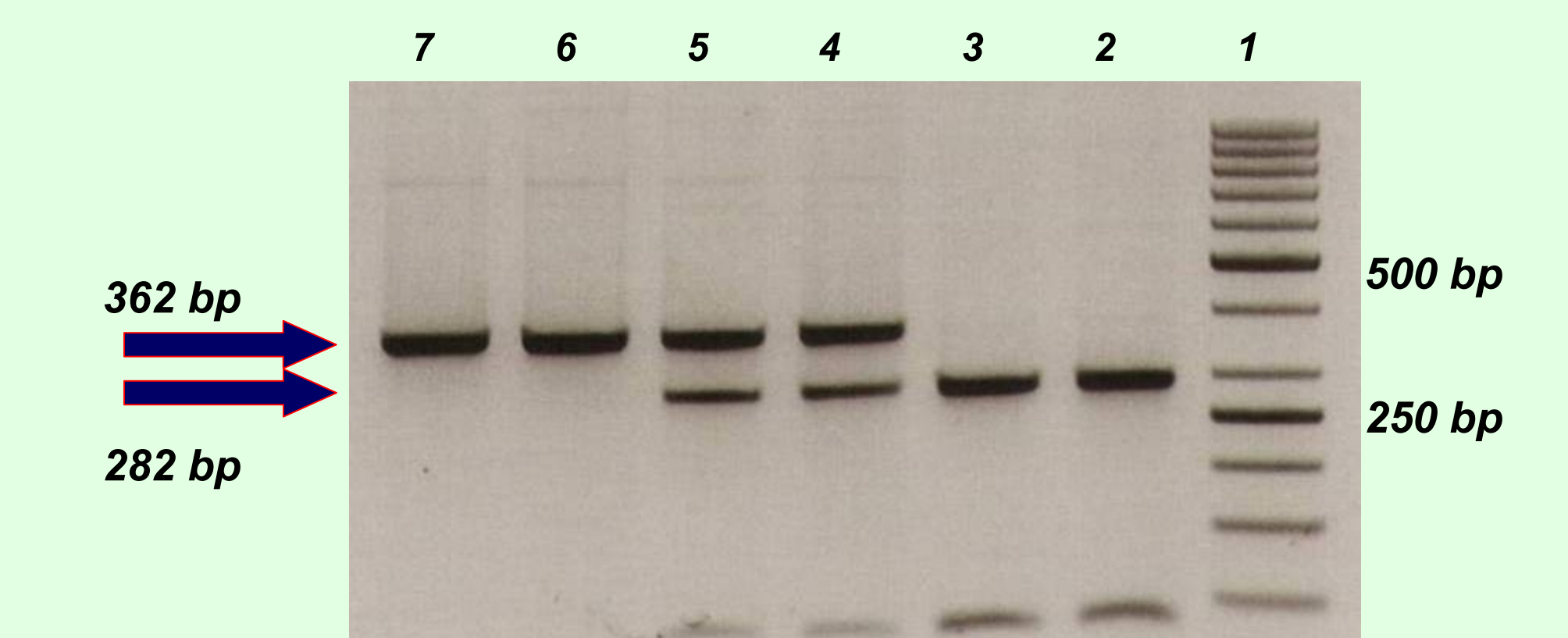
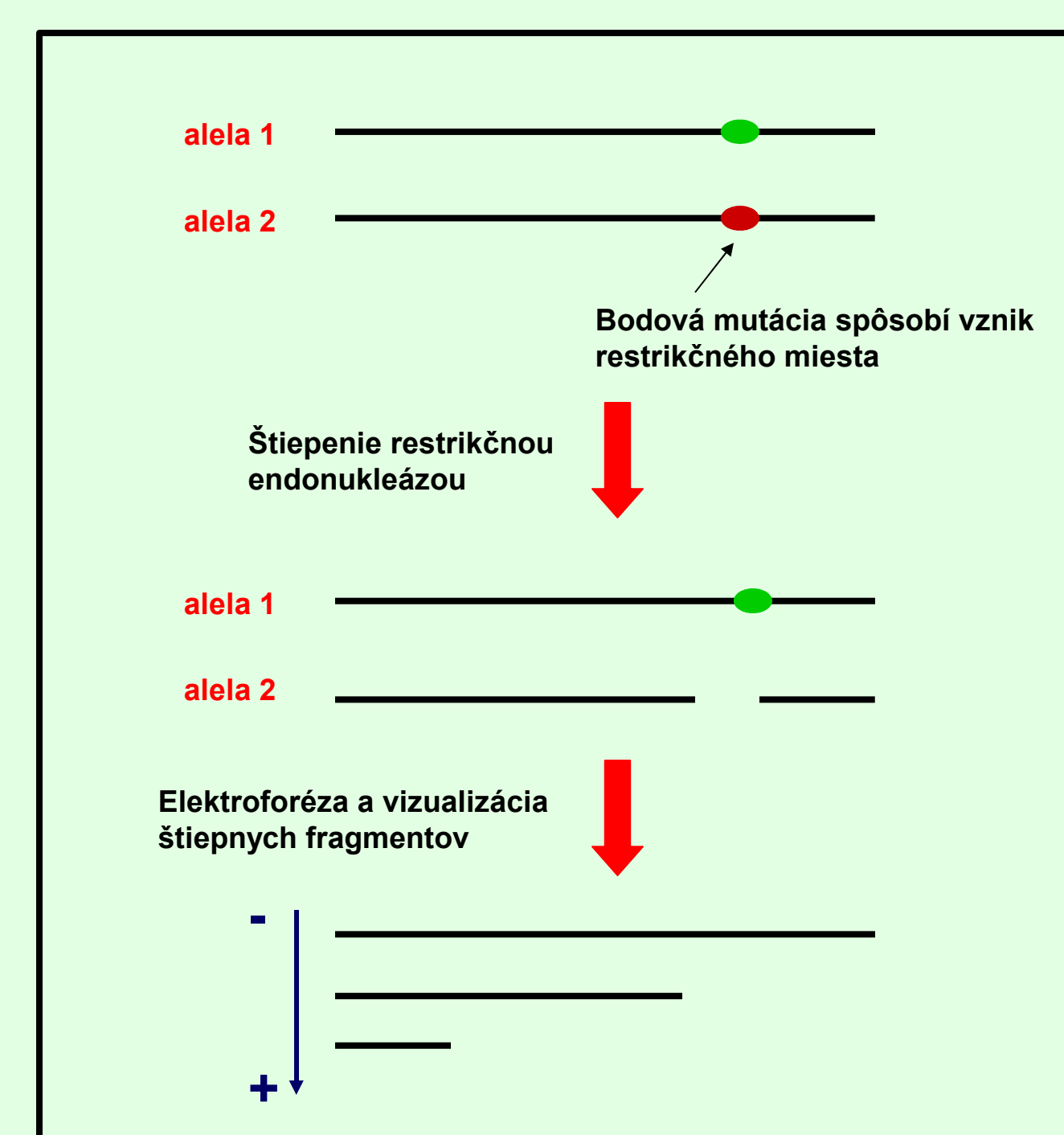


Niektoré možnosti využitia PCR:

- genetický výskum a klinická genetika (detekcia mutácií a mapovanie génov)
- klinické disciplíny (onkológia, detekcia patogénnych činiteľov a rekombinantné lieky)
- súdne lekárstvo (kriminalistika a identifikácia osôb)
- sporná paternita a identifikácia príbuznosti
- historická antropológia, archeológia a vývojová biológia

PCR – RFLP – Polymorfizmus dĺžky restrikčných fragmentov (Restriction Fragment Length Polymorphism)

PCR - RFLP sa stala štandardnou metódou pri vyšetrovaní vzoriek DNA a pri detekcii mutácií. Restričné endonukleázy (restriktázy) majú významné postavenie v DNA diagnostike mnohých dedičných ochorení. Restriktázy sú v bakteriálnych bunkách súčasťou restrično – modifikačného systému, ktorý chráni bunku pred vstupom cudzorodej DNA, najčastejšie vírusového pôvodu. Restriktázy štiepia DNA v špecifických miestach. Rozpoznávacie miesta restriktáz pozostávajú zo štyroch až ôsmich nukleotidov. Každá restriktáza má svoj kód, ktorý je určený na základe dohodnutej nomenklatúry zohľadňujúcej rodový a druhový názov organizmu, kmeň mikroorganizmu a taktiež R-M systém v prípade ak existuje viacero systémov v bunke. HindI je restriktáza produkovaná baktériou *Hemophilus influenzae*, kmeňom d a predstavuje R-M I systém. Prítomnosť špecifických restričných miest možno využiť na rýchle, veľmi jednoduché a presné odhalenie mutácií, v prípadoch, kde je patologický stav podmienený známou mutáciou. Ak bodová mutácia zruší restričné miesto v DNA sekvencii pre danú restriktázu, z dvoch fragmentov vznikne jeden a naopak, vznik nového restričného miesta spôsobí rozdelenie pôvodného fragmentu na dva. Detekcia mutácie sa teda zakladá na polymorfizme dĺžky restričných fragmentov, čo umožňuje odlišiť štiepenú alelu od neštiepenej.

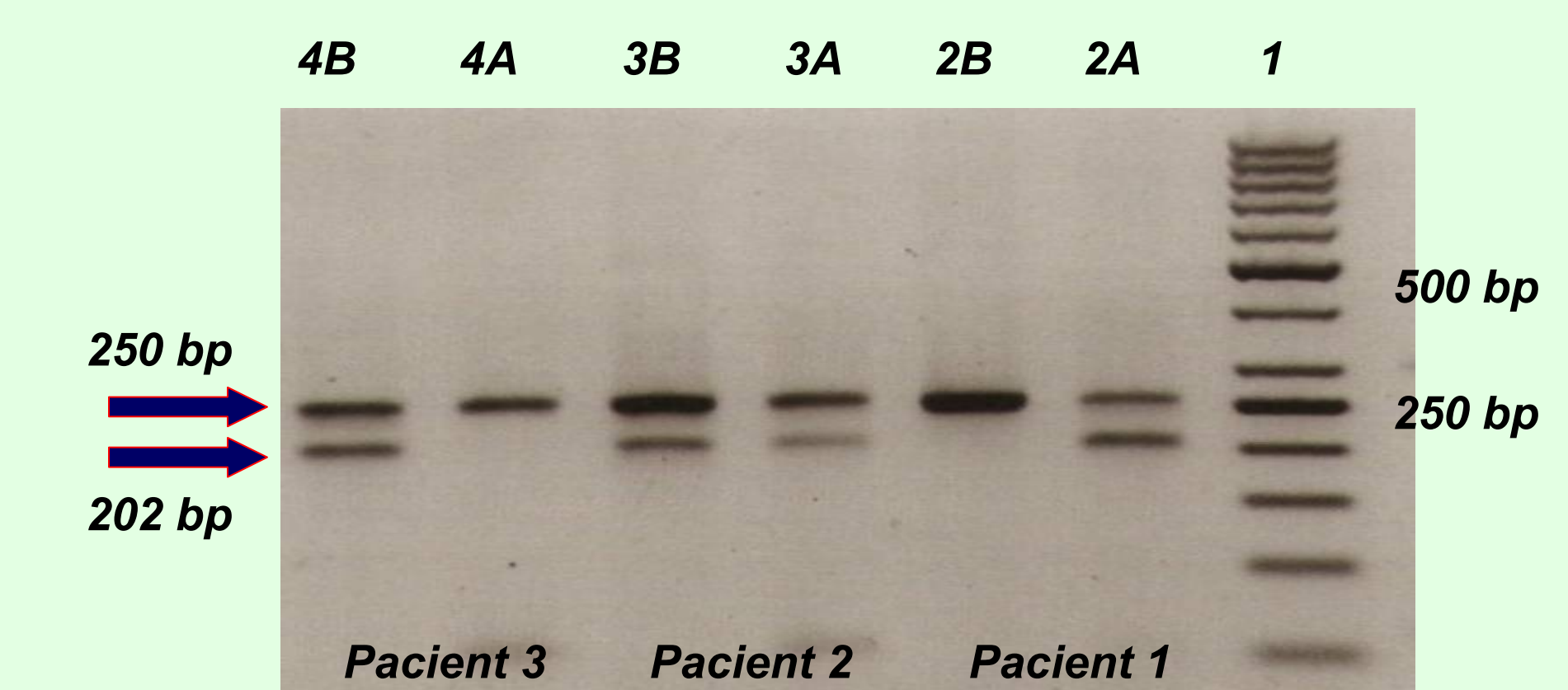
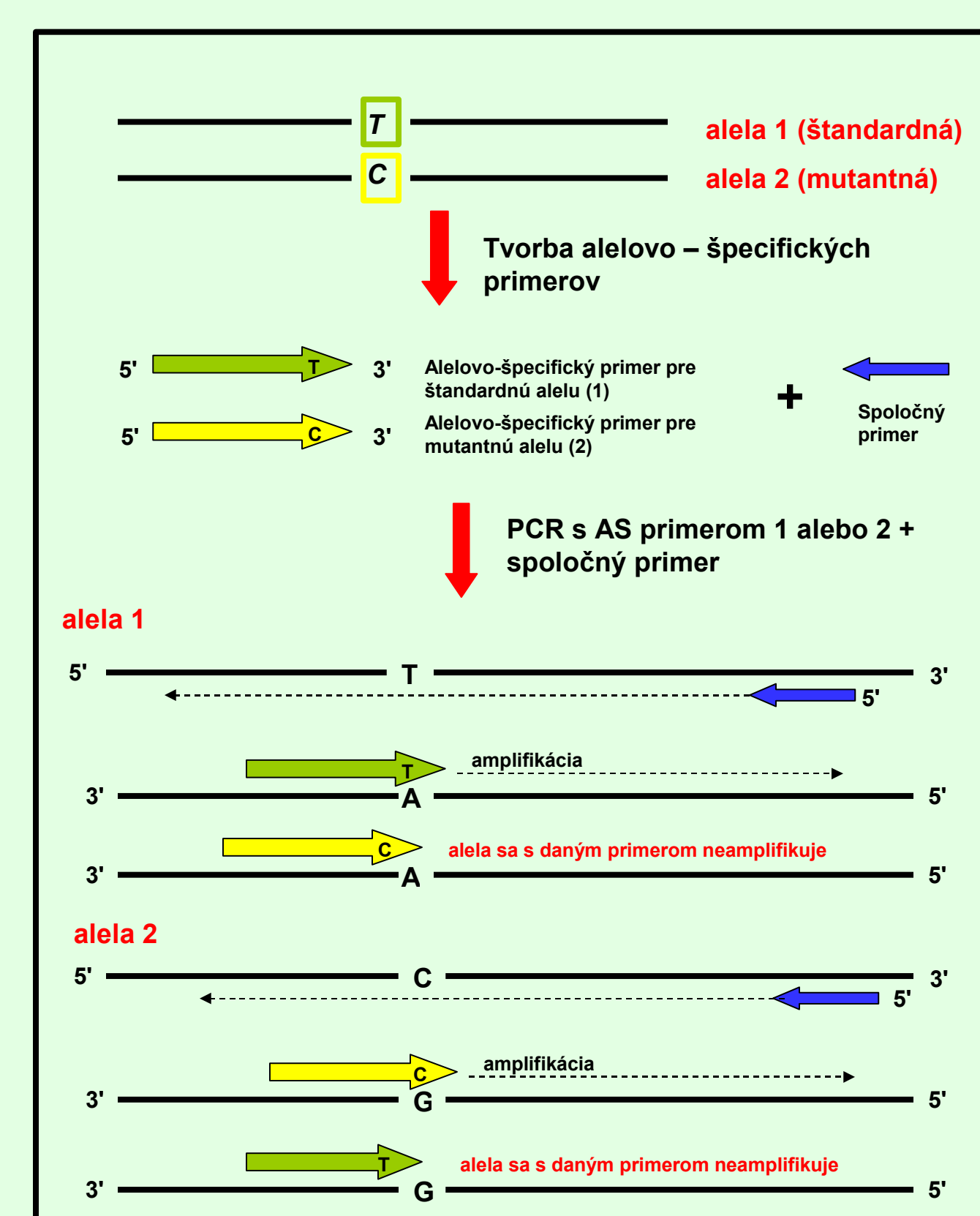


Restričná analýza mutácie W151X v exóne 6 pri ochorení Smith-Lemli-Opitzov syndróm.

Bodová mutácia TGG→TAG spôsobí vznik rozpoznávacej sekvencie pre restriktázu AluI, ktorá rozpoznáva sekvenciu AGCT. Dráha 1: marker molekulovej hmotnosti delený po 50bp, dráhy 2, 3 homozygot pre mutáciu W151X (štiepený fragment 282 bp + 80 bp), dráhy 4, 5 heterozygot pre mutáciu W151X (štiepený aj neštiepený fragment), dráhy 6, 7 homozygot pre divý alelu (neštiepený fragment 362 bp).

AS – PCR (ARMS) : Alelovo špecifická PCR

Alelovo špecifická PCR poskytuje informáciu o prítomnosti alebo neprítomnosti mutácie na jednej alele génu a preto na stanovenie genotypu jedinca je nutné, aby prebehli dve PCR reakcie. Jedna reakcia slúži na amplifikáciu alely bez mutácie a obsahuje primer špecifický pre štandardnú alelu. Druhá reakcia obsahuje primer špecifický len pre mutantnú alelu a neamplifikuje štandardnú alelu génu. Pri AS – PCR sa teda navrhujú dva typy alelovo-špecifických primerov, jeden pre štandardnú, druhý pre mutantnú alelu. Primery sú sekvenčne identické, odlišujú sa jedine bázou na 3' terminálnom konci, čím sa zabezpečí preferenčná amplifikácia jednej alely pred druhou. Z dôvodu vylúčenia nesprávnej genotypizácie v dôsledku zlyhania PCR sa do každej reakcie pridáva ďalší pár alelovo-nešpecifických primerov pre kontrolnú amplifikáciu.



AS – PCR pri detekcii mutácie L109P (CTT→CCT) v exóne 5 pri ochorení Smith-Lemli-Opitzov syndróm.

Genotypizácia jedinca je založená na prítomnosti PCR produktu iba v jednej alebo v oboch reakciách. Pacient 1: homozygot pre štandardnú alelu má PCR produkt prítomný jedine v reakcii slúžiacej na amplifikáciu štandardnej alely génu (dráha 2A, PCR produkt o dĺžke 202 bp), Pacient 3: homozygot pre danú mutáciu má PCR produkt v reakcii slúžiacej na amplifikáciu mutantnej alely (dráha 4B, PCR produkt o dĺžke 202 bp), Pacient 2: heterozygot pre danú mutáciu, má PCR produkt v oboch reakciách (dráha 3A a 3B). Kontrolný PCR produkt o dĺžke 250 bp vo všetkých dráhach. 1: marker molekulovej hmotnosti.

RT – PCR : Real – time PCR

Real – time PCR monitoruje emitovanú fluorescenciu počas PCR reakcie. Zvyšovanie fluorescence indikuje amplifikáciu DNA v reálnom čase (narozdiel od konvenčnej PCR → detekuje sa až po skončení reakcie).

Real – time PCR výhody:

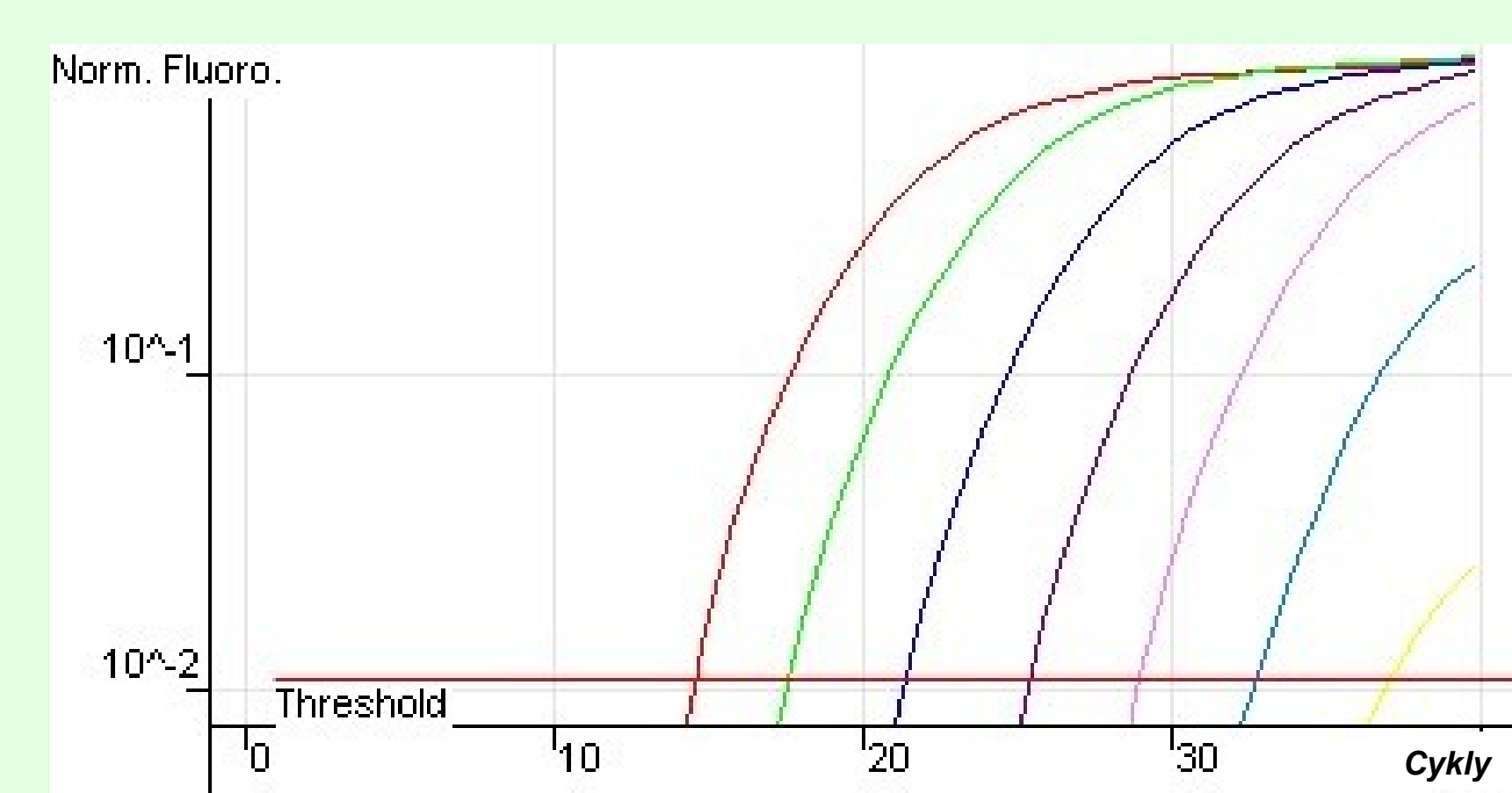
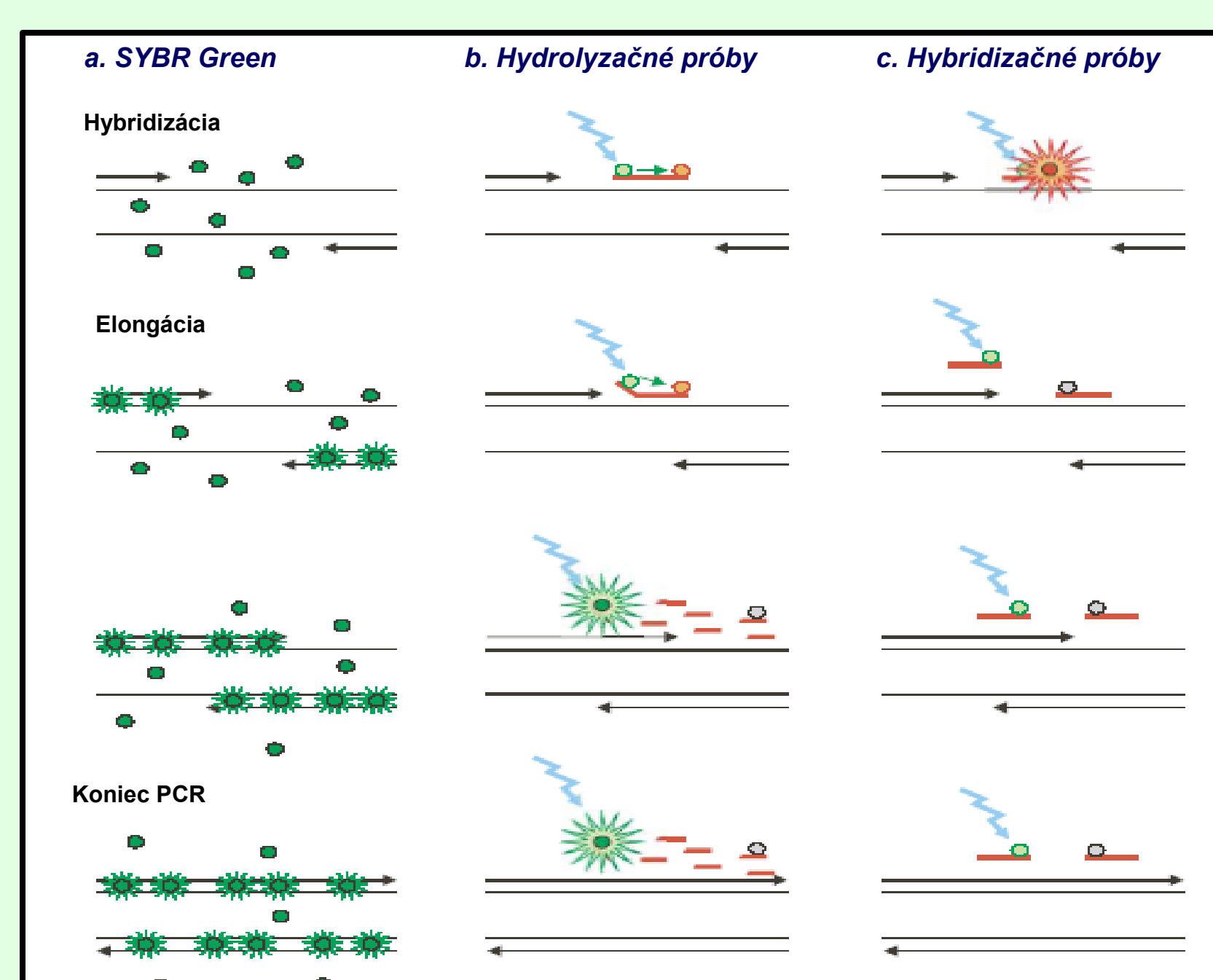
- neovplyvňovaná nešpecifickou PCR amplifikáciou
- amplifikácia monitorovaná v reálnom čase
- žiadne post PCR spracovanie (žiadna elektroforéza)
- menšie riziko kontaminácie
- veľmi nízke množstvo templátu (1 kópia génu)
- potvrdenie špecificity amplifikovaného PCR produktu pomocou melting analýzy (získavanie teploty topenia PCR produktu)
- špecifickejšia, senzitivnejšia a reprodukovateľnejšia ako konvenčná PCR

Real-time PCR nevýhody:

- nie je ideálna pre multiplexovanie
- navrhnutie real-time PCR protokolu je komplikovanejšie ako pri konvenčnej PCR
- cena prístroja je podstatne vyššia ako cykléra pre konvenčnú PCR

Tri základné metódy – princípy pre kvantitatívnu detekciu :

- DNA- viažuce agensy: (SYBR Green)
- Hydrolyzačné próby: (TaqMan, Beacons, Scorpions)
- Hybridizačné próby: (Light Cycler)



Série desiatkového riedenia templátu



Real – time prístroj