

Přímá diagnostika dědičných chorob analýzou nukleových kyselin

Umožňuje zachytit a **identifikovat mutaci zodpovědnou za onemocnění** u postižených a ve sledované rodině.

Podmínkou je **znalost lokalizace genu** a znalost jeho standardní sekvence. Nabízejí možnost odhalení heterozygotního přenašeče mutované alely i u jedince, v jehož příbuzenstvu postižený jedinec není znám. Vyšetření začíná v úsecích genu s nejvyšším počtem mutací.

Metody, které zachytí jakoukoliv odchylku od standardní sekvence DNA

Většina metod využívá k detekci PCR. U většiny genů nelze provést vyšetření v jedné reakci a to z důvodu jejich velikosti. Pomocí zvolených primerů jsou postupně amplifikovány jednotlivé úseky genu.

Analýza heteroduplexů

Založena na **detekci chybného párování bazí** (mismatch). K tomu dochází při hybridizaci komplementárního vlákna DNA standardního a mutantního typu, kdy vznikají hybridní molekuly DNA – heteroduplexy. Vytvářejí se v místech s delecemi nebo insercemi několika bazí. Principem je **rozdílná elektroforetická mobilita** dsDNA v případě dokonalé a nedokonalé komplementarity.

 *Podrobnější informace naleznete na stránce Heteroduplexová analýza.*

DGGE

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Vychází z **rozdílného bodu tání** v závislosti na složení dsDNA. Heteroduplexy a homoduplexy – migrují při elektroforéze gelem s lineárně se zvyšujícím množstvím denaturačních činidel. V místě, kde koncentrace denaturačních činidel odpovídá teplotě, při které dochází k částečné denaturaci DNA, se migrace parciálně denaturovaného úseku DNA značně zpomalí nebo zastaví. DNA **heteroduplexy jsou méně stabilní** a proto se jejich vlákna částečně separují dříve než vlákna homoduplexů – zpomalí svou mobilitu v gelu a migrují do jiné pozice.

 *Podrobnější informace naleznete na stránce DGGE.*

High Resolution Melt

Detekce mutací a polymorfismů v dsDNA. Výhodou metody je rychlost a levnost.

Postup: PCR - HRM analýza = zvýšení teploty na teplotu tání, což vede k separaci vláken DNA. Proces je možné zachytit v reálném čase. Navázání fluorescenčního barviva na DNA.

Chemické nebo enzymatické štěpení heteroduplexů

Technika mismatch cleavage. Štěpení jednovláknového místa – tam, kde není úplná komplementarita obou vláken. Elektrofores v denaturovaném gelu – průkaz přítomnosti štěpených nebo neštěpených fragmentů testované DNA.

Záchyt velkých delecí

Delece postihující celý exon nebo gen nejsou běžnými metodami identifikovatelné. Lze je odhalit pomocí metod Southern blotting. V případě rozsáhlých delecí lze využít metoda FISH.

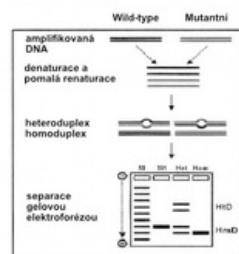
Real time PCR

Zjištění přesného počtu kopií určitých sekvencí nukleové kyseliny v buňkách. Umožňuje **monitorovat množství produktu DNA** v každém cyklu PCR. Např. při zjištění hladiny virové infekce, počtu kopií onkogenu.

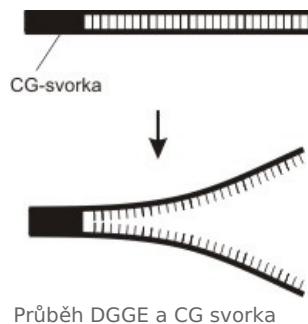
DNA čipy

Nejslibnější z moderních metod. Lze využít v kombinaci s počítačovým hodnocením výsledků.

Heteroduplexní analýza



Obecné schéma heteroduplexní analýzy

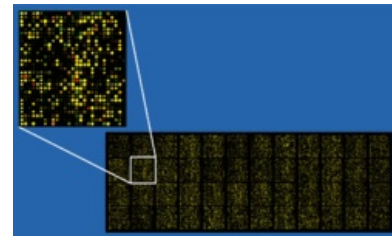


 [Podrobnější informace naleznete na stránce DNA čipy.](#)

Následující metody se již nepoužívají!

SSCP metoda

Single Strand Conformation Polymorphism Analysis. Založena na analýze ssDNA (jednovláknová DNA), využívá PCR. Amplifikovaný úsek DNA je denaturován a nanesen na polyakrylový gel. Je-li ve vyšetřovaném úseku DNA přítomna mutace, jednovláknová DNA **zaujme odlišnou konformaci** (odlišná pohyblivost této DNA v gelu). Vlákna je možné vizualizovat – radioaktivní značení oligonukleotidů pro PCR.



Dvoukanálový DNA čip

 [Podrobnější informace naleznete na stránce SSCP.](#)

RT-PCR

Výchozím materiálem je izolovaná RNA, která je konvertována do cDNA pomocí reverzní transkriptázy a amplifikovaná PCR. Poté je testována na přítomnost mutací. Umožňuje testovat větší úseky. Zachytí **aberrantní sestřih** nebo aktivaci **kryptického místa** sestřihu, které jsou běžnými metodami velmi těžko identifikovatelné.

PTT

Protein Truncation Test. Metoda specifická pro detekci mutací, které mají za následek **vznik předčasného terminačního kodonu** a tím zkrácení proteinového produktu. Z izolované mRNA je reverzní transkripcí a následnou PCR připravena cDNA, dále je provedena transkripce a *translace in vitro*. Velikost proteinového produktu testována elektroforeticky a srovnána s délkou standardního produktu. Používá se pro detekce frameshift a nonsense mutací.

Sekvenování DNA

Využití zejména v závěrečné fázi vyšetření. Odhalí odchylky v nukleotidové sekvenci DNA.

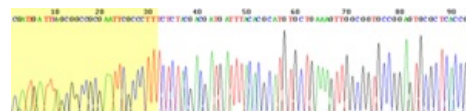
Sangerova metoda

Nejčastěji používaná.

Základem je použití **směsi standardních deoxynukleotidtrifosfátů** (dNTPs) a **modifikovaných dideoxynukleotidtrifosfátů** (ddNTPs) při přípravě úseku DNA, který bude sekvenován. Modifikovaný ddNTPs má za následek ukončení syntézy DNA. Výsledkem **syntézy DNA** je série různě dlouhých molekul DNA, které se v délce liší vždy o **jeden nukleotid**.

Celý proces probíhá ve 4 separátních enzymových reakcích. Každá obsahuje - **templátovou DNA** v jednovláknové podobě, **DNA-polymerasu**, **primer**, 4 **dNTPs** a modifikovaný nukleotid **dideoxynukleotidtrifosfát** (ddNTPs). V každé ze 4 reakcí je jiný ddNTP - ddATP, ddGTP, ddCTP, nebo ddTTP.

Po skončení sekvenace jsou molekuly DNA **separovány kapilární elektroforézou** - produkty procházejí kapilárou, kde se dělí dle velikosti. Jestliže je do sekvenační reakce přidán dNTP označený **radioaktivně** - je možné vzniklou DNA detekovat na **rtg filmu** v podobě viditelných pruhů **všech 4 linií**.



Výsledek sekvenace úseku DNA automatickým sekvenátorem

Metody detekce specifických mutací

Lze je použít tam, kde má většina postižených v populaci **jednu nebo omezený počet mutací** Např. srpkovitá anémie, cystická fibróza.

Mutačně-specifická analýza RFLP

V případě, kdy mutace **vytváří nebo ruší restrikční místo** pro určitý restrikční enzym a zároveň je příčinou onemocnění. Metodou PCR dochází k amplifikaci úseku DNA s restrikčním místem. Následuje restrikce specifickými restrikčními enzymy a gelová elektroforéza.

ASO

Alelově Specifické Oligonukleotidy. Syntetizovány k detekci bodové nukleotidové difference v sekvenci DNA.

Diagnostika expanze trinukleotidů

DNA diagnostika v případě Huntingtonovy choroby. Amplifikace (PCR) v oblasti genu s vysokým obsahem repetitivních (CAG)_n. Následuje elektroforéza v polyakrylamidovém gelu. **Počet repetitivních souvisí s rozvojem onemocnění.** Při detekci Syndromu fragilního X je možné použít PCR pro detekci standardních nebo premutančních alel. Plné mutace jsou příliš dlouhé.

Odkazy

Související články

- Vyhledávání mutací
- PCR

Zdroj

- ŠTEFÁNEK, Jiří. *Medicína, nemoci, studium na 1. LF UK* [online]. [cit. 2009]. <<https://www.stefajir.cz/>>.

Použitá literatura

- KOHOUTOVÁ, Milada. *Lékařská biologie a genetika (II. díl)*. 1. vydání. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2013. 202 s. ISBN 978-80-246-1873-9.