

Metode molekularne biologije I: Analiza DNA i genoma

DNA je vrlo dugačka molekula

- haploidni genom čovjeka ima 3,164,700,000 parova baza \approx 1 m (promjer jezgre je oko 10 μ m)
- zbog slaganja parova baza DNA je razmjerno kruta molekula

10^{13} stanica \times 2 m = 182.000.000.000 km
(610 puta do sunca i nazad)

Genetička informacija organizma sadržana je unutar genoma

- **Genom**
 - ukupna DNA organizma
 - virusi - jednolančana ili dvolančana DNA ili RNA
 - svi stanični organizmi - dvolančana DNA
 - veličina genoma raste prema višim organizmima (bakterija - 3 Mpb; čovjek - 3000 Mpb)
- **Gen**
 - funkcionalna jedinica genoma
 - odsječak DNA koji kodira za polipeptidni lanac ili molekulu RNA
- **Ekspresija gena**
 - nastanak genskog produkta
- **Središnja dogma molekularne biologije**
 - prijenos genske poruke: DNA \rightarrow RNA \rightarrow PROTEIN

Čovjek ima oko 30.000 gena



Pan troglodytes
30.000 gena
98% homologije



Mus musculus
30.000 gena
90% homologije



Danio rerio
30.000 gena
85% homologije



D. melanogaster
13.600 gena
36% homologije



A. thaliana
25.000 gena
26% homologije



S. cerevisiae
6.275 gena
23% homologije



C. elegans
19.000 gena
21% homologije

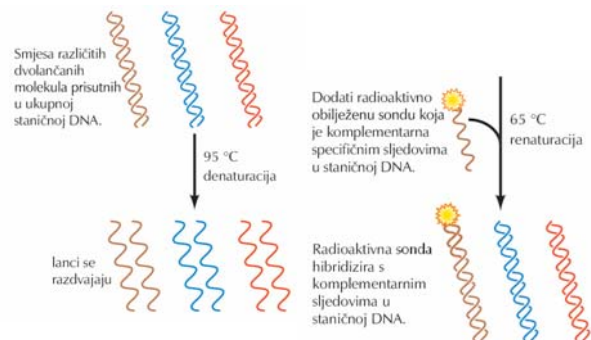


E. coli
4.800 gena
7% homologije

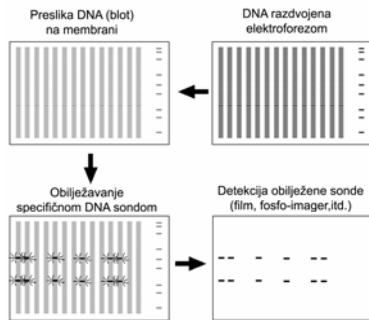
U načelu se provode dva tipa analize DNA

1. **Analiza slijeda**
 - Identifikacija mutacija i polimorfizama (SNP)
 - Dijagnosticiranje nasljednih bolesti
 - Utvrđivanje prisutnosti strane DNA
 - Određivanje slijeda nukleotida u nekoj DNA
 - ...
2. **Analiza genske ekspresije**
 - Poremećaji genske ekspresije u bolestima
 - Utjecaj lijekova na gensku ekspresiju
 - Ispitivanje funkcije pojedinih gena
 - ...

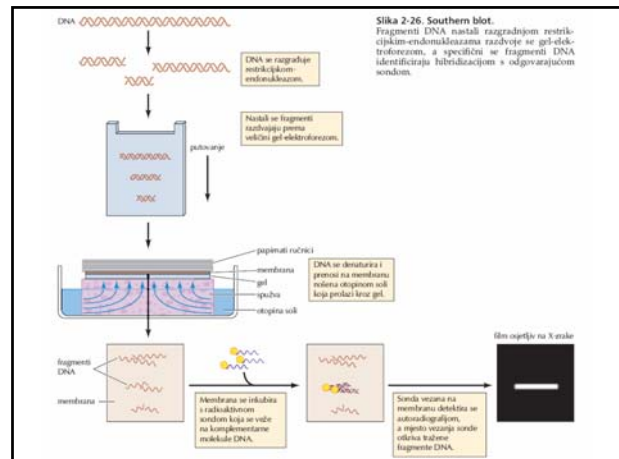
Komplementarne molekule DNA i RNA povezuju se u otopini (hibridiziraju)



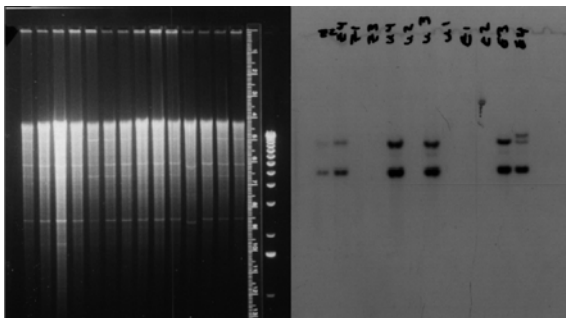
Southern (DNA) blot analiza ispituje prisutnost određenog slijeda nukleotida u DNA pomoću specifične hibridizacije s DNA-sondom



Southern (blot) analizu uveo je Edwin Southern po kome je i nazvana.



Primjer southern blot analize

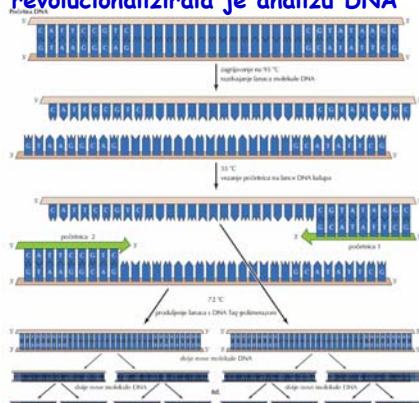


Stanična DNA pokidana EcoRI restrikcijskim enzimom i razdvojena elektroforezom u 0,7% agaroznom gelu (lijevo), southern blot analiza specifičnog gena (desno)

Postupak southern blot analize

1. Razgradnja DNA restrikcijskim ednonukleazama
2. razdvajanje molekula DNA elektroforezom u agaroznom gelu
3. razdvajanje niti DNA (denaturacija)
 - 0.5 M NaOH
4. prijenos DNA (blot) na nitroceloznu membranu
 - pasivnom difuzijom ili elektroforetički
5. fiksiranje DNA za membranu (temperatura, UV)
6. hibridizacija s obilježenom sondom
7. detekcija

Lančana reakcija polimeraze (PCR) revolucionizirala je analizu DNA



Za provođenje lančane reakcije polimeraze potrebno je imati:

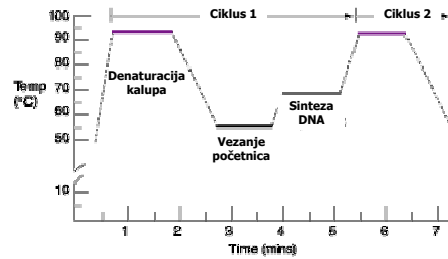
- Izoliranu DNA
- Dvije specifične početnice (engl. *primer*)
- Termostabilnu polimerazu (*Taq*)
- Smjesu 4 dNTP
- Mg^{2+}
- Odgovarajući pufer

Lančanom reakcijom polimeraze možemo u svega nekoliko sati dobiti milijarde identičnih kopija nekog ciljanog fragmenta DNA

Lančana reakcija polimeraze



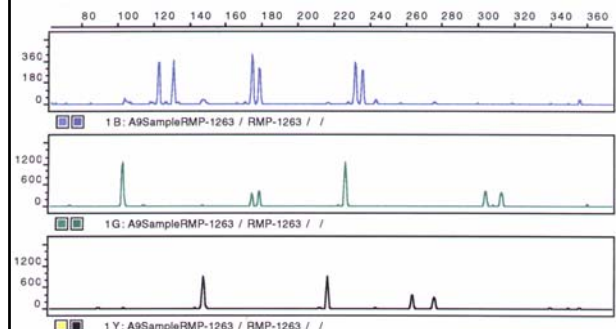
Tijek lančane reakcije polimeraze



Multipleks PCR

- istovremena analiza više segmenata DNA u istom uzorku
- istovremeno se koristi više parova početnica
 - moraju imati slične optimalne temperature za vežanje (podjednaka dužina i GC sastav)
- optimiranje je vrlo složeno
- optimirane metode su vrlo informativne
 - jednoznačna identifikacija ljudi, očinstva i sl.

Primjer multipleks-PCR analize



Genetički otisak prsta

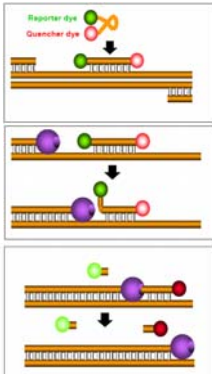
Identifikacija PCR produkata

- identifikacija na agaroznom gelu
 - neobilježene početnice
 - detekcija etidij-bromidom ili sličnom bojom
 - razmjerno slaba osjetljivost i razlučivanje
 - jednostavna oprema
- identifikacija fluorescentnih produkata
 - početnice obilježene fluorescentnim biljezima
 - vrlo pogodne za multipleks analize
 - do 16 različitih analiza u jednoj reakciji
 - odlično razlučivanje i vrlo velika osjetljivost
 - vrlo skupa i složena oprema

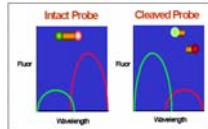
Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu

- "Real-time" PCR
- kontinuirana analiza produkata lančane reakcije polimeraze
- omogućava pouzdanu kvantifikaciju
 - eliminira problem "plato"-faze kod kvantifikacije "klasičnim" PCR metodama
- eliminira potrebu za analizom produkata
- skupa oprema (\$50,000 - 100,000)
 - "običan" PCR je \$5,000 - \$10,000
- razmjerno ograničena mogućnost multipleksa

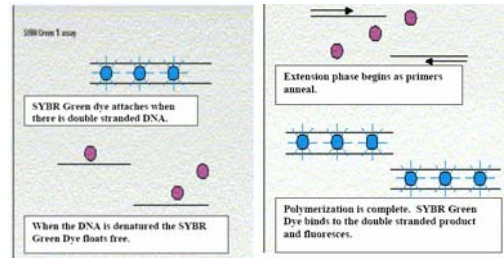
Princip lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu (Taqman metoda)



- unutarnja sonda ima vezanu fluorescentnu boju "R" i prigušivač "Q" (quencher)
 - fluorescira tek nakon razdvajanja R i Q
- unutarnju sondu razgrađuje Taq polimeraza (5'→3' egzonukleaza)
- količina fluorescencije razmjerna je količini PCR produkta
- primjena različito obilježenih unutarnjih sondi omogućava multiplexnu analizu



SYBR® Green tehnologija

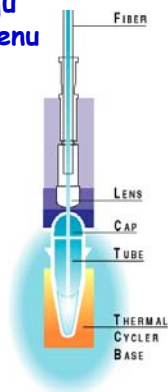


SYBR® Green je boja koja fluorescira samo kad je vezana da dvolančanu DNA

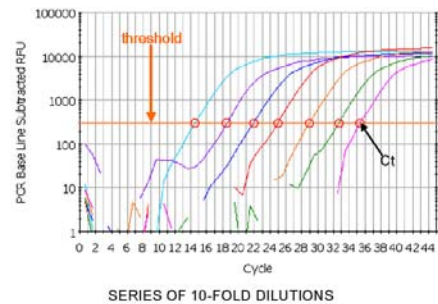
Oprema za lančanu reakciju polimeraze u stvarnom vremenu



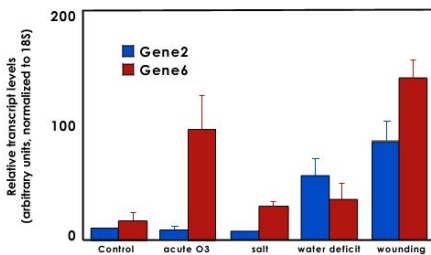
ABI PRISM 7700



Kontinuirana analiza produkata omogućava pouzdanu kvantifikaciju

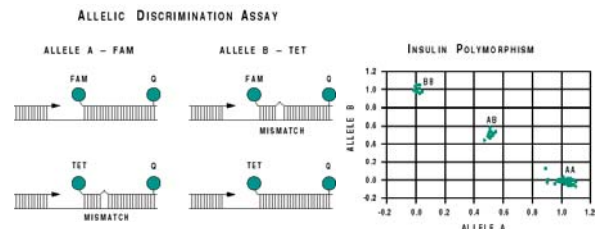


Kvantifikacija s pomoću Real-Time PCR (relativna kvantifikacija)



Relative transcript levels calculated as $x = 2^{-\Delta\Delta C_t}$, where x = fold difference in amount of starting material between two treatments.
 $\Delta\Delta C_t = \Delta E - \Delta C$, and $\Delta E = C_{tH} - C_{t18S}$; $\Delta C = C_{tcontrol} - C_{t18S}$.

Analiza genskog polimorfizma pomoću lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu

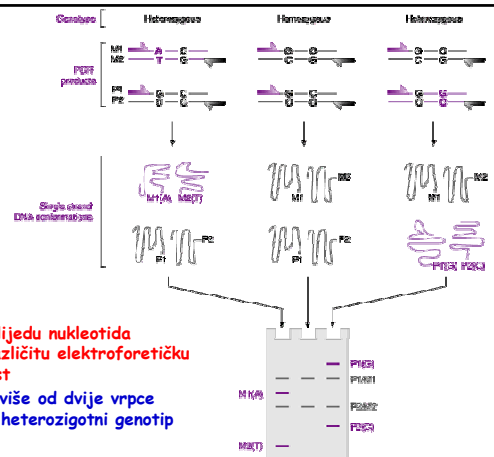


Početak čiji slijed nije identičan slijedu baza u genu (koja ima nesporene baze) slabije će se vezati te će doći do njezine manje razgradnje i posljedično manjeg signala.

Polimorfizam konformacije jednolančane DNA

- **SSCP** - Engl. *Single Strand Conformational Polymorphism*
- temelji se na činjenici da jednolančane molekule DNA iste duljine, no različite sekvence tijekom nenedaturirajuće elektroforeze putuju različitim brzinama
 - zbog stvaranja sekundarnih struktura koje ovise o slijedu nukleotida

SSCP



Alel-specifične početnice



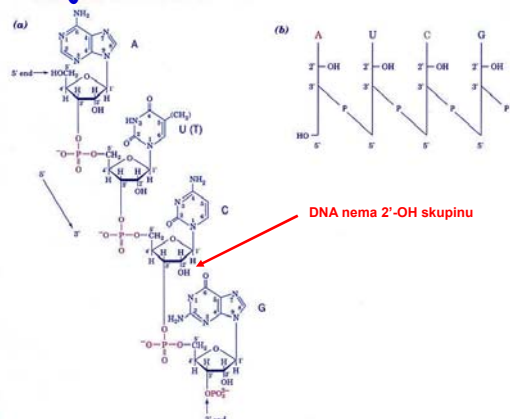
- Engl. *Allele specific primers (primer extension assay)*
- početnice na 3' kraju odgovaraju jednom od alela
- do sinteze DNA i stvaranja PCR produkta dolazi samo ukoliko je kalup potpuno komplementaran početnici

Primjena analize slijeda u dijagnostici

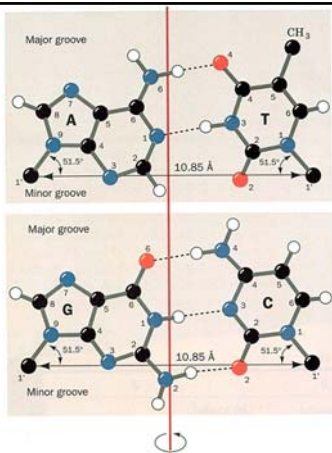
- prenatalna dijagnostika
- nasljedne bolesti
 - cistična fibroza
- tumorski markeri i prognostički faktori
- tipizacija mikroorganizama
 - E. coli
 - humani papiloma virusi
- utvrđivanje identiteta i oćinstva
- farmakogenomika

ODREĐIVANJE SLIJEDA NUKLEOTIDA U DNA

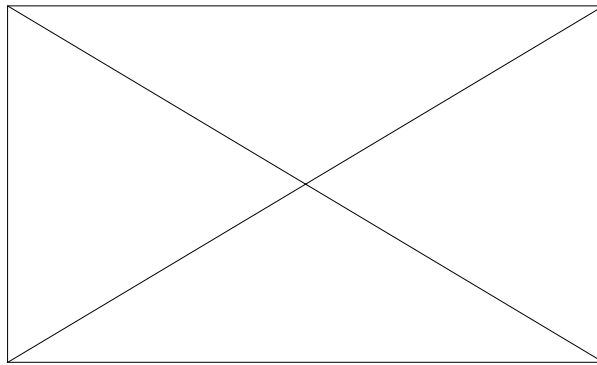
Kemijska struktura nukleinskih kiselina



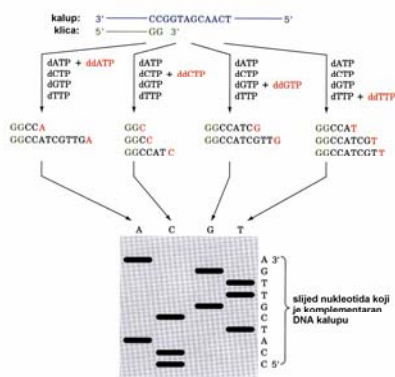
U strukturi DNA
A se uvijek nalazi
nasuprot T, a G
nasuprot C
(Parovi baza prema
Watsonu i Cricku)



Sangerova dideoksi metoda sekvenciranja DNA



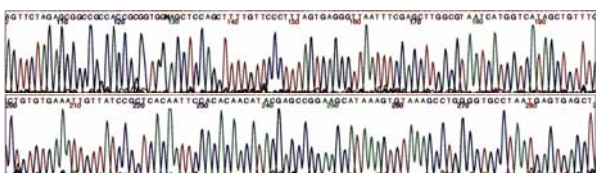
Shematski prikaz sekvenciranja DNA Sangerovom dideoksi metodom



Sekvenciranje lančanom reakcijom polimeraze ("Cycle Sequencing")



Elektroferogram sekvenciranja DNA Sangerovom dideoksi metodom



- razdvajanje kapilarnom ili gel-elektroforezom
- dideoksi nukleotidi obilježeni fluorescentnim bojama

U načelu se provode dva tipa analize DNA

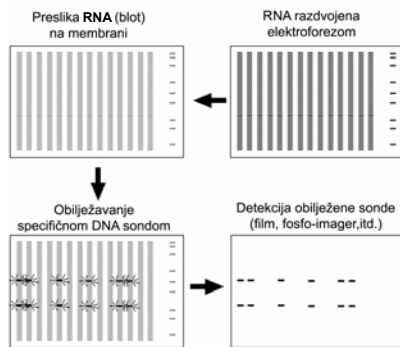
1. Analiza sekvence

- Identifikacija mutacija i polimorfizama (SNP)
- Dijagnosticiranje nasljednih bolesti
- Utvrđivanje prisutnosti strane DNA
- Određivanje slijeda nukleotida u nekoj DNA
- ...

2. Analiza genske ekspresije

- Poremećaji genske ekspresije u bolestima
- Utjecaj lijekova na gensku ekspresiju
- Ispitivanje funkcije pojedinih gena
- ...

Northern (RNA) blot analiza



Northern (blot) analiza nazvana je analogijom s southern blot analizom.

RT-PCR

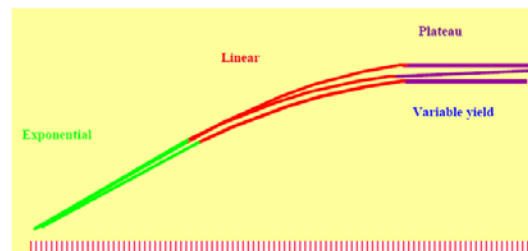
- za analizu molekula mRNA (ekspresije gena)
- prije lančane reakcije polimeraze mRNA se pretvara u DNA pomoću **reverzne transkriptaze**
 - nastaje tzv. cDNA (komplementarna DNA)



Kvantifikacija PCR produkata

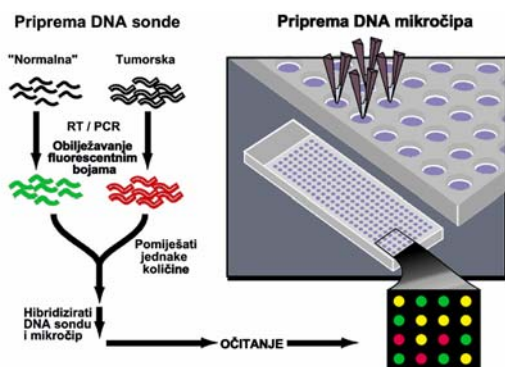
- **usporedba s koamplificiranim standardom**
 - β -aktin ili GAPDH
 - smatra se da se njihova ekspresija ne mijenja s promjenom uvjeta u okolini
 - semikvantitativna metoda
 - omogućava samo relativnu usporedbu ekspresije ispitivanog i referentnog gena
- **kompetitivni RT-PCR**
 - u reakciju se dodaje poznata količina referentne DNA
 - omogućava izražavanje rezultata u apsolutnim vrijednostima
 - rezultat se izražava u odnosu na ukupnu DNA (RNA)

Pouzdana kvantifikacija moguća je samo u području eksponencijalne amplifikacije



Lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu je metoda izbora za kvantitativnu analizu DNA i RNA.

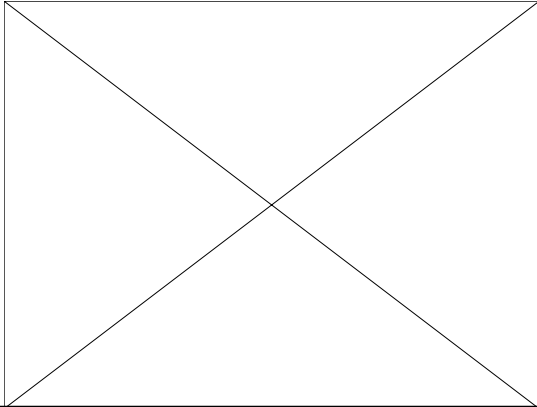
DNA-mikročip tehnologija



Područja primjene DNA-mikročip tehnologije

- otkrivanje novih gena
- dijagnostika
- otkrivanje novih lijekova
 - Farmakogenomika
- toksikološka istraživanja
 - Toksikogenomika
- GeneChip® Human Genome U133 Set
 - preko 1.000.000 oligonukleotida koji identificiraju 39.000 specifičnih transkriptata 33.000 gena

DNA-mikročip analiza ekspresije gena



Fluorescentna in situ hibridizacija (FISH)

