

Martin Kuthan

Hybridizační metody studia nukleových kyselin

S rozvojem metod analýzy nukleových kyselin a jejich běžným používáním v moderní biologii přibývají i články v Živě, které se na ně odkazují. Při experimentech je často potřeba zjistit množství nebo velikost konkrétní molekuly DNA či RNA ve vzorku obsahujícím značný počet podobných molekul. Mnohdy nás zajímá obsah mRNA určitého genu v daném typu tkáně, změna množství určité mRNA v závislosti na různých podmínkách či nalezení úseku DNA obsahujícího studovaný gen. Takové informace je možné získat mimo jiné pomocí hybridizačních metod, které v tomto článku podrobněji popíšeme.

Při práci s biopolymery, jako jsou DNA, RNA či proteiny, potřebujeme molekuly velmi často rozdělit podle velikosti. K tomuto účelu využíváme elektroforézu, ústřední metodu molekulární biologie. Tato technika je založena na skutečnosti, že se molekuly biopolymerů v roztoku pohybují v elektrickém poli rychlostí závislou na poměru jejich náboje a hmotnosti. Pokud mají dvě molekuly např. stejnou hmotnost a tvar, bude se molekula s větším nábojem pohybovat v elektrickém poli rychleji. Nukleové kyseliny obsahují fosfátové skupiny, které jim udělují negativní náboj, takže se v elektrickém poli pohybují ke kladné elektrodě. Bez ohledu na svou velikost však mají téměř stejný poměr náboje a hmotnosti, protože jejich stavební bloky (nukleotidy) mají přibližně stejnou hmotnost a náboj. Pokud by elektroforéza probíhala pouze v roztoku, nebyli bychom téměř schopni rozdělit různé velké molekuly. Proto se při elektroforetické separaci biopolymerů používá místo roztoku agarózový nebo polyakrylamidový gel. Ten vytváří jakési molekulární síto s kanálky umožňujícími pohyb dělených molekul. Velikost pórů v gelu omezuje pohyblivost molekul, takže nukleové kyseliny s téměř stejným poměrem náboje a hmotnosti se v elektroforetickém gelu dělí podle své velikosti. V praxi to znamená, že delší molekuly nukleových kyselin se pohybují v gelu pomaleji než kratší molekuly. Pomocí elektroforézy je možné rozlišit fragmenty lišící se pouze o několik procent své délky. U kratších molekul s délkou maximálně několik set nukleotidů je možné elektroforeticky oddělit i molekuly lišící se o jediný nukleotid!

Elektroforeticky rozdělené molekuly v gelu se pak zviditelňují vhodným barvením. Pro DNA se velmi často používá fluorescenční barvivo ethidium bromid. Po osvětlení UV lampou tato látka navázaná na DNA oranžově fluoreskuje, přičemž nenavázaná barva fluoreskuje pouze slabě. Výsledkem gelové elektroforézy je charakteristický vzor pruhů, přičemž každý pruh obsahuje molekuly o určité velikosti.

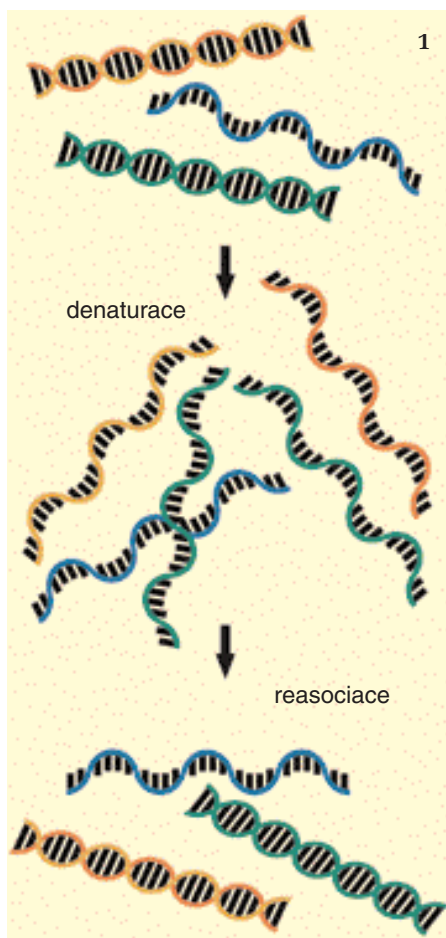
Gelová elektroforéza se využívá při nejrůznějších postupech analýzy DNA (např. klonování či sekvenace DNA). Elektroforetické gely však mohou sloužit také jako výchozí materiál pro blotovací techniky. Než se dostaneme k samotným technikám, připomeňme si některé důležité vlastnosti nukleových kyselin.

Hybridizace DNA

DNA je negativně nabitá dvojitá molekula. Dvě antiparalelní vlákna jsou tvořena lineárním polymerem deoxyribonukleotidů. Báze jsou na jednotlivých

vlákních uspořádány tak, že navzájem specificky interagují s bázemi na druhém vlákně prostřednictvím vodíkových vazeb (adenin – A – se páruje s tymínem – T, cytosin – C – s guaninem – G). Protože báze párují specificky, mluvíme o komplementaritě vláken: na základě znalosti sekvence jednoho vlákna je možné odvodit sekvenci vlákna druhého. Ačkoli jsou vodíkové vazby poměrně slabé, jejich vysoký počet (spolu s patrovými interakcemi heterocyklů bází) činí dvoušroubovicovou strukturu molekuly DNA velmi stabilní. Pokud je však molekula DNA vystavena působení vysoké teploty či silně alkalického pH, dojde k její denaturaci – rozrušení vodíkových vazeb a patrových interakcí, což vede k oddělení jednotlivých vláken. V případě, že pomalu snížíme teplotu (a/nebo pH), mohou se oddělená vlákna znovu spojit a vytvořit stejnou dvoušroubovici jako původní molekula. Ve směsi různých nukleových kyselin reasociují pouze komplementární vlákna – tento proces prakticky není ovlivněn přítomností nekomplementárních vláken (obr. 1). Tato specifická reasociace se též označuje jako hybridizace nukleových kyselin a může k ní dojít i mezi komplementárními vlákny DNA a RNA. Pokud se pro reasociaci použije DNA z různých buněk či organismů, je možné na základě míry hybridizace určit vzájemnou podobnost sekvencí – vyšší míra hybridizace znamená vyšší podobnost. Počátečním krokem je náhodné nalezení krátké komplementarity a vytvoření několika párů bází. Následuje rychlé „zazipování“ zbylých komplementárních částí vláken.

K rychlé tvorbě dvoušroubovice dochází po snížení teploty tam, kde se vlákna nukleových kyselin z nějakého důvodu úplně neoddelila (např. při částečné denaturaci či při kovalentním propojení vláken). Stabilita dvoušroubovicové molekuly DNA může být vyjádřena pomocí teploty tání (označované T_m), přibližně odpovídající teplotě, při které je polovina dvoušroubovicové DNA denaturována na jednovláknovou. Zvyšování teploty nad tuto hodnotu vede k přerušení vodíkových vazeb a následné separaci vláken, naopak snižování teploty pod tuto úroveň vede k reasociaci vláken. Teplotu T_m určité dvoušroubovice ovlivňuje zastoupení jednotlivých párů bází, délka a počet nepárujících oblastí a dále iontová síla roztoku. Vodíkové vazby mezi páry AT jsou méně stabilní než vodíkové vazby mezi páry GC, proto vyšší obsah párů GC v sekvenci znamená stabilnější interakci a vyšší teplotu tání dvoušroubovice. Delší dvoušroubovicové úseky jsou odolnější vůči denaturaci než kratší úseky, přítomnost nepárujících bází snižuje odolnost vůči denaturaci. Důležitým faktorem je i pH a složení roztoku. Přítomnost jednomocných kationtů (zvýšení iontové síly roztoku) stabilizuje dvoušroubovici tím, že kompenzuje záporné



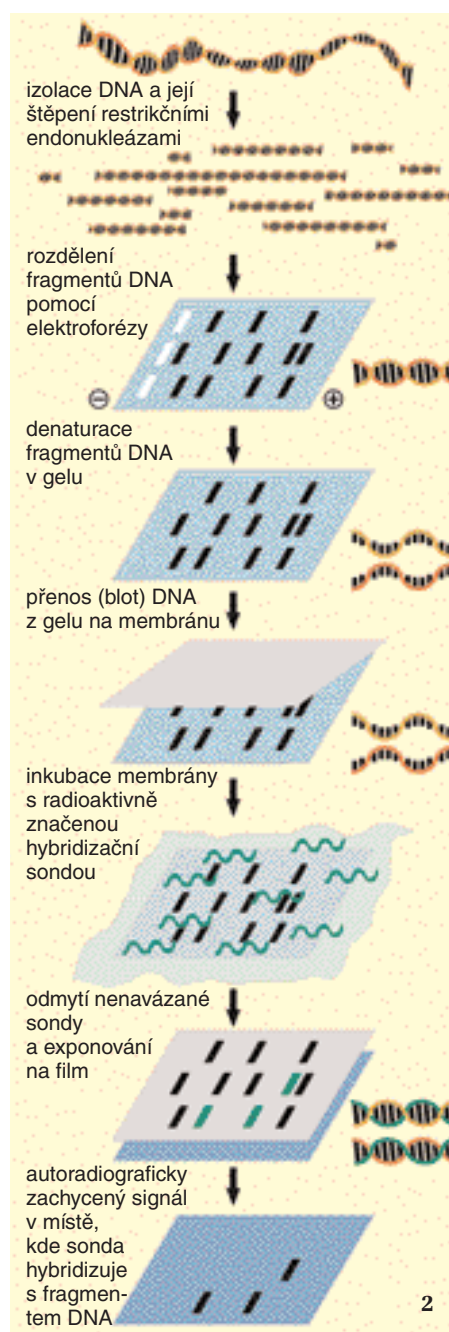
1 Hybridizace nukleových kyselin. Působením denaturačního činidla dojde k oddělení jednotlivých vláken dvoušroubovice a po navození vhodných renaturačních podmínek se jednovláknové molekuly párují (na základě komplementarity bází) opět do dvoušroubovice.

elektrostatické odpudivé síly fosfátových skupin. Opačný vliv na teplotu tání má přidání různých organických látek. Zvýšení koncentrace formamidu o 1 % vede ke snížení teploty tání přibližně o 0,7 °C.

Jednou z nejběžnějších aplikací využívajících hybridizaci nukleových kyselin je technika známá jako Southern blot (Southernův přenos) pro vyhledávání příbuzných sekvencí v DNA. Vyvinul ji Edward Southern v r. 1975 a její podstatou je využití značených molekul nukleových kyselin (tzv. sond) pro zkoumání směsi nukleových kyselin imobilizovaných na pevné podložce. Princip metody je na první pohled banálně jednoduchý. Pokud je potřeba identifikovat určitý fragment DNA v elektroforetickém gelu, musí se DNA z gelu přenést na nějaké jiné médium tak, aby se zachovaly proužky (resp. rozdělení molekul) získané elektroforézou. Tento přenos je nezbytný, protože pokud by DNA zůstala v gelu příliš dlouho, tak by rozdělené molekuly vyputovaly z gelu vlivem difuze. Zde je podstata celé Southernovy metody – DNA je z gelu přenesena na nitrocelulóзовou membránu. Na membráně se tak vytvoří kopie gelu, DNA se imobilizuje a dá se s ní dále pracovat. To je počátek techniky, která se stala základem mnoha metod molekulární biologie využívaných v diagnostice i výzkumu.

Při technice Southern blot (obr. 2) se DNA naštěpí jedním nebo několika restrikčními enzymy a výsledné fragmenty se elektroforeticky rozdělí. Ponořením gelu do silně alkalického pufru dojde k denaturaci DNA. Na gel se potom položí nitrocelulóзовá nebo nylonová membrána a gel se s ponechání vztlákolmo na směr elektroforézy směrem k membráně. Tím se fragmenty DNA vymyjí z gelu na membránu, na kterou se naváží. Na membráně tak získáme přesnou repliku elektroforetického rozdělení fragmentů DNA. Fragmenty delší než 20 kb však mohou zůstat při přenosu uvězněny v gelu. Proto je zvláště před přenosem větších fragmentů vhodné gel ponořit do zředěné kyseliny chlorovodíkové, čímž dojde k částečné depurinaci (ztrátě purinové báze A či G) a při následné denaturaci v alkalickém pufru ke štěpení fragmentů DNA v místech bez purinových bází.

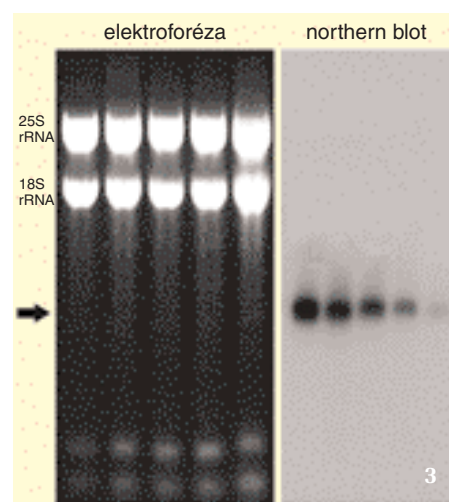
V současnosti se upřednostňuje použití pozitivně nabitých nylonových membrán před nitrocelulóзовými. Nitrocelulóзовé membrány jsou křehké a vážou DNA nekovalentně (poměrně slabě prostřednictvím hydrofobních interakcí), takže je možné její uvolnění. Nylonové membrány mají lepší mechanické vlastnosti, DNA se na ně váže nevratně kovalentní chemickou vazbou. Po přenosu je DNA fixována na membráně vysokou teplotou (nitrocelulóза) nebo pomocí UV záření (nylon, propojení UV zářením). V případě kladně nabitých nylonových membrán je možné použít při přenosu alkalický pufr obsahující hydroxid sodný, což zrychlí přenos DNA a navíc dojde ke kovalentnímu připojení DNA na membránu bez dalších zásahů. Po přenosu DNA na membránu se k membráně přidá radioaktivně (nebo neradioaktivně) značená sonda, specifická pro studovaný gen. Může jí být vyčištěná RNA, cDNA (vzniká reverzní transkripcí z mRNA) či segment



DNA klonovaný *in vivo* nebo *in vitro* pomocí polymerázové řetězové reakce – PCR (Živa 2007, 4: 184–185). Značená sonda hybridizuje s určitou částí (nebo fragmenty), které obsahují sekvenci komplementární k sondě. Detekce hybridizované sondy (např. autoradiografií při radioaktivním značení) poskytne specifický vzor proužků odpovídajících restrikčním fragmentům obsahujícím komplementární sekvenci k použité sondě.

Analýza RNA

Analogická technika hybridizační analýzy RNA byla nazvána northern blot („northernový“ přenos). Tato metoda je jednou z možností, jak analyzovat expresi genů (obr. 3), sledovat přítomnost či nepřítomnost vybraných transkriptů nebo studovat alternativní sestřih mRNA. Pro analýzu se používá buď celková RNA, nebo izolovaná mRNA. Protože mRNA tvoří v buňce jen zlomek procenta celkového obsahu RNA, je lepší použít pro studium málo exprimovaných mRNA jako výchozí materiál izolovanou mRNA. Zacházení



2 Schéma metody Southern blot.

V případě využití radioaktivního značení izotopem fosforu ^{32}P je možné zobrazit signál sondy na rentgenovém filmu. Modernější a pohodlnější variantou je přímá digitalizace signálu přístrojem PhosphorImager.

3 Analýza exprese kvasinkového genu *TIP1* metodou northern blot. Celková RNA byla po izolaci z buněk rozdělena na elektroforéze (levá část obrázku). Nahoře jsou dobře patrné pruhy ribozomální RNA, v dolní části méně zřetelné pruhy malých buněčných RNA. Molekuly mRNA jsou různé dlouhé a tvoří pouze část celkové RNA, takže není možné rozeznat pruhy jednotlivých mRNA (šipka označuje přibližné místo výskytu *TIP1* mRNA). Pomocí techniky northern blot je možné zobrazit pruh konkrétní mRNA a získat informace o jejím množství (pravá část obrázku). V případě analýzy exprese genu *TIP1* je vidět, že s přibývajícím stářím kvasinkových buněk (zleva doprava – 3, 4, 5, 7 a 10 dní) postupně klesá množství jeho mRNA (výsledky laskavě poskytl V. Štoviček). Všechna schémata orig. M. Kuthana

s RNA je hlavní odlišností oproti postupům pro Southern blot. Protože RNA je jednovláčková molekula schopná tvořit sekundární struktury ovlivňující její elektroforetickou pohyblivost, je nutné použít tzv. denaturační elektroforézu. Jako vhodná denaturační činidla se používají formamid či dimethylsulfoxid (DMSO). Kromě toho je RNA daleko citlivější na degradaci a je nutné důsledně ji chránit před účinkem všudypřítomných RNáz (enzymů štěpících RNA). Před hybridizací se sondou není nutné RNA na membráně denaturovat, protože je jednovláčková a tudíž schopná vázat jednovláčkovou DNA či RNA sondu.

Pozornému čtenáři možná neunikl malý rozdíl v překladech názvů hybridizačních technik (Southernův přenos, „northernový“ přenos). Tento rozdíl je názorným příkladem toho, že i ve „vážné“ vědě může být ukryta špetka humoru. Protože při „jižním“ přenosu (Southern blot) se pracuje s DNA, nazvali autoři metodu přenosu RNA „severní“ (northern blot). Tato slovní hříčka měla velký úspěch, takže obdobná metoda pro přenos proteinů na membránu nese název „západní“ (western blot).