

Vyhledávání mutací

Jako **techniky vyhledávání mutací** označujeme metody, které umožňují najít v populaci jedince se vzácnými polymorfismy nebo dosud neznámými mutacemi. Mohou být také použity pro zjištění, zda určité úseky DNA získané od různých jedinců jsou shodné, nebo se vzájemně liší. Při vyhledávání mutací se vlastně postupuje obdobně: úsek DNA od mnoha různých jedinců se srovnává s referenční DNA (divokou alelou genu apod.).

Polymorfismus konformace jednoduchých řetězců

Jedná se o techniku **vyhledávání mutací** v genomu. Patří mezi nejjednodušší techniky k této činnosti. Bývá označovaná zkratkou **SSCP** (single strand conformation polymorphism, **polymorfismus konformace jednořetězcové DNA**).

Princip techniky

Jejím principem je elektroforéza jednovláknové DNA na nedenaturujícím polyakrylamidovém gelu při nízké teplotě. Řetězec DNA se „sbalí“ podle vnitřních komplementarit, čímž vznikne prostorová struktura podobná např. tRNA. Rychlost, jakou pak jednořetězcová DNA putuje během elektroforézy nukleových kyselin, závisí na přesné konformaci. Protože i velmi malá změna v sekvenci nukleotidů může způsobit, že DNA vytvoří úplně jinou prostorovou strukturu, je možné pomocí SSCP **odlišit často i záměnu jediné báze**.

Práce s PCR

Při práci s většinou PCR produktů se DNA během SSCP rozdělí do dvou skupin frakcí: První skupina putuje pomaleji, proužky bývají ostřejší a bývá jich větší počet. Druhá frakce putuje rychle a zpravidla tvoří jediný pruh.

Důvodů, proč jeden PCR produkt tvoří několik proužků, je několik:

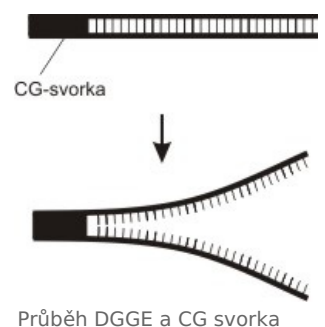
- každý řetězec denaturované DNA zaujme jinou konformaci,
- jeden řetězec může tvořit více stabilních konformací,
- část molekul nevytvoří sbalenou prostorovou strukturu,
- část molekul renaturuje do původní dvoušroubovice a vzniknou tak znovu homoduplexy,
- u heterozygotů může část molekul renaturovat za tvorby heteroduplexů.

Spolehlivost techniky

Uvádí se, že při práci s úsekem DNA dlouhým 100–300 bp lze pomocí SSCP zachytit 99 % bodových mutací, pro úseky dlouhé 400 bp více než 80 %. S rostoucí délkou vyšetřovaného fragmentu DNA účinnost SSCP klesá a pro úseky delší než asi 750 bp není tato technika vhodná.

DGGE

Velmi citlivou technikou pro vyhledávání mutací je **elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu** (denaturing gradient gel electrophoresis, **DGGE**). Využívá se při ní toho, že rychlost denaturace DNA závisí na počtu vodíkových můstků. Řetězce DNA se od sebe budou snáze oddělovat v místech bohatých na AT páry, zatímco úseky bohaté na CG budou stabilnější. Pro elektroforézu se používá polyakrylamidový gel s postupně se zvyšující koncentrací denaturujících látek (formamidu a močoviny). Vyšetřovaná DNA putuje v elektrickém poli rychlostí, která odpovídá její molekulové hmotnosti, až do okamžiku, kdy se oba řetězce začnou od sebe oddělovat. Vznikající denaturovaná vlákna putují při elektroforéze mnohem pomaleji, takže čím snáze se určitý úsek denaturuje, tím blíže startu se vzorek DNA zastaví. Protože zcela oddělené ssDNA by vytvořily neostře proužky, používají se při amplifikaci DNA primery s tzv. CG-svorkou. PCR produkt pak obsahuje dvoušroubovice, které mají na jednom konci samé CG páry; v tomto místě se řetězce denaturují jen nesnadno. Citlivost DGGE se blíží 100 %.



TGGE

Podobnou technikou je **TGGE** (temperature gradient gel electrophoresis, **gelová elektroforéza s teplotním gradientem**). Namísto gelu s postupně se zvyšující koncentrací denaturujících látek se při ní používá postupně se zvyšující teploty gelu.

Heteroduplexová analýza

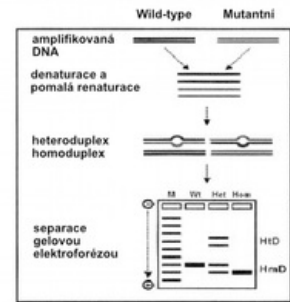
Analýza heteroduplexů je metoda **přímé** molekulárně genetické diagnostiky příbuzná DGGE. Analyzovaný vzorek se smísí s referenční DNA, denaturuje se a pak se nechá opět hybridizovat.

Pokud se sekvence referenční DNA liší od vzorku (například kvůli přítomnosti mutace), vzniknou kromě původních homoduplexů i smíšené molekuly tvořené jedním řetězcem ze vzorku a jedním z referenční DNA. Protože takové heteroduplexy obsahují nekomplementární úsek bez vodíkových můstků, budou se při elektroforéze na denaturačním gelu rozpadat podstatně dříve.

Jinou možností je štěpení heteroduplexů v místě nekomplementarity. To je možné chemicky nebo, spolehlivěji, enzymaticky (např. T4 endonukleasou VII nebo T7 endonukleázou I). Tento přístup se označuje jako **enzyme mismatch cleavage (EMC)**. Uvádí se, že účinnost dosahuje 90 %.

V současné době se tento typ analýzy již prakticky nepoužívá a byl nahrazen sekvenovacími metodami.

Heteroduplexní analýza



Obecné schéma heteroduplexní analýzy.