

**VYBRANÉ BIOCHEMICKÉ A MOLEKULÁRNE-BIOLOGICKÉ METÓDY
V LEKÁRSKOM VÝSKUME A MEDICÍNSKEJ DIAGNOSTIKE.**

Skriptá

Ol'ga Križanová

Ústav molekulárnej fyziológie a genetiky SAV, Vlárská 5, 833 34 Bratislava

Ústav lekárskej biochémie, JFL UK, Malá Hora 4, 036 01 Martin

Skriptá sú určené pre študentov doktorandského štúdia z vedného odboru Klinická biochémia, ale tiež pre študentov 2. ročníka LF ako pomocné skriptá pre predmet Lekárska biochémia.

OBSAH

GENETICKÉ A MOLEKULÁRNE BIOLOGICKÉ METÓDY	3
Genetika - náuka o dedičnosti	3
METÓDY ŠTÚDIA DNA A RNA	6
Izolácia DNA a RNA	7
Southernov blot	8
Polymerázová reťazová reakcia	10
Reverzná PCR (RT-PCR)	12
Optimalizácia PCR	14
DNA polymerázy	18
Problémy s PCR	20
Aplikácie PCR	21
Sekvenovanie PCR produktov	24
Ďalšie metódy štúdia génovej expresie	25
Využitie princípu metódy PCR	29
Princípy sekvenovania	38
METÓDY ŠTÚDIA PROTEÍNOV	40
Izolácia proteínov	41
Polyakrylamidová gélová elektroforéza (PAGE)	42
Prenos (blotovanie) proteínov na membránu -WESTERN BLOT	47
Chromatografia	52
IMUNOLOGICKÉ METÓDY	56
Metódy, ktoré využívajú neznačený antigén/protilátku	60
Metódy so značeným antigénom/protilátkou	64
Výšetrovacie metódy pre alergiu a autoimunitné ochorenia	67
Záver	71
Použitá literatúra	72

GENETICKÉ A MOLEKULÁRNE - BIOLOGICKÉ METÓDY

GENETIKA – NÁUKA O DEDIČNOSTI

Genetika je náuka o dedičnosti. Ako teoretická a zároveň praktická disciplína má široké praktické uplatnenie v pochopení a kontrole genetických ochorení. Genetická informácia je vlastne súbor dedičných informácií, ktoré sú umiestnené na chromozómoch. Genetická informácia je lokalizovaná v **deoxyribonukleovej kyseline (DNA)** a z jadra sa prenáša **ribonukleovou kyselinou (RNA)**. Nukleové kyseliny sú jedinými molekulami, ktoré sú schopné túto informáciu prenášať. Základnou jednotkou dedičnosti je **gén**. Gén je sekvencia nukleotidov DNA, ktorá obsahuje kódujúce (exóny) a nekódujúce (intróny) oblasti. Počet génov závisí na organizačnej komplexite organizmu, jeho počet varíruje od zhruba 5000 u baktérií, až po zhruba 22000 u ľudí a iných cicavcov. Súbor génov v každom organizme sa nazýva **genóm**. Gény sú umiestnené na **chromozómoch** – komplexných štruktúrach, ktoré sa nachádzajú v bunkovom jadre a ktoré sú zložené z DNA a špeciálnych proteínov. Ľudský jedinec má 23 párov, pričom 23-tý pár určuje pohlavie – XY u mužov a XX u žien. Niektoré ochorenia sú dané abnormalitami v chromozómovej výbave.

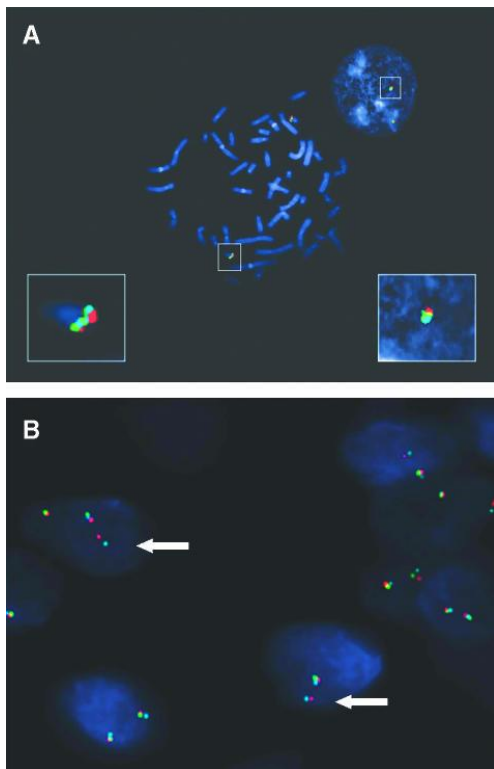
Chromozómové abnormality zohrávajú dôležitú úlohu v množstve klinických situácií:

- Sú príčinou neplodnosti.
- Viac ako 50% spontánnych potratov v prvom trimestri je v dôsledku chromozómových abnormalít embrya.
- Zhruba 1 novorodenec z 200 má viacpočetné kongenitálne abnormality v dôsledku chromozómových abnormalít. Prenatálny skrining môže objaviť takéto abnormality v čase, kedy ešte je možné uskutočniť potrat, pokiaľ si to rodičia budú želať.
- Najviac detí s chromozomálnymi abnormalitami sa rodí rodičom, ktorí majú chromozomálnu výbavu normálnu, ale zhruba 1% ľudí má nepatrne chromozomálne

zmeny, ktoré nemajú vplyv na ich zdravotný stav, ale zaradujú ich do kategórie „rizikových“ rodičov s rizikom postihnutia ich potomstva.

- Rakovinové bunky typicky získavajú extenzívne chromozómové abnormality, ktoré nie sú prítomné v normálnych bunkách pacienta, a množstvo týchto abnormalít má diagnostický a prognostický význam.

Na štúdium chromozómov sú potrebné bunky, ktoré sa delia, lebo iba tu sú chromozómy viditeľné. Najčastejšími vzorkami, ktoré sa odoberajú na štúdium chromozómov sú periférne krvné lymfocyty, choriové klky, amniotická tekutina, kožné biopsie a testikulárne biopsie. Samozrejme, tieto vzorky obsahujú veľmi málo deliacich sa buniek. Preto sa napríklad ku krvným vzorkám pridáva fytohemaglutinín, ktorý stimuluje delenie lymfocytov a po 48 hodinách kolcemid, ktorý zabrzdí bunky v metafáze. Veda, ktorá ďalej skúma chromozómy, počíta ich, identifikuje a študuje ich štruktúru sa nazýva **cytogenetika**. Chromozomálne abnormality môžu vzniknúť buď v dôsledku chybného počtu chromozómov (trizómia 21 - Downov syndróm), alebo v dôsledku štrukturálnych abnormalít niektorých chromozómov. Štrukturálne zmeny sú založené na prestavbách na molekulovej úrovni. V súčasnosti sú dostupné fluorescenčne značené DNA sondy, ktorými sa po naviazaní na príslušnú časť chromozómu dajú mnohé z týchto zmien detegovať pomocou fluorescenčného mikroskopu. Táto metóda sa nazýva **FISH** (Fluorescenčná In Situ Hybridizácia) a najčastejšie sa využíva pri diagnostike onkologických ochorení, pri ktorých dochádza k výrazným chromozómovým prestavbám (Obrázok 1). Výhodou FISH metódy je jej rýchlosť, vysoká efektívnosť hybridizácie a detekcie, množstvo buniek, ktoré je možné v jednom stanovení analyzovať a tiež fakt, že bunky sa nemusia replikovať.



Obrázok 1. Ukážka metódy FISH. A – celkový pohľad na farbené chromozómy; značené sondy sa naviazali len na chromozóm, kde nastali chromozómové prestavby; B - tri rozdielne fluorescenčne značené sondy sa špecificky naviazali na miesta, kde sa uskutočnili chromozómové prestavby.

V roku 1901 De Vries spozoroval, že gény môžu meniť obsah svojej informácie. Pre tento jav zaviedol pojem **mutácia**. Systematická analýza mutácií bola na začiatku 20. storočia základom rozvoja vednej oblasti genetiky. Medzi prvé poznatky patrili zistenia, že röntgenové lúče môžu indukovať mutácie. Postupne sa ukázalo, že aj niektoré chemické látky vyvolávajú mutácie. Dlhú však nebolo jasné, čo v skutočnosti mutácie sú, pretože sa nepoznal základ prenosu genetickej informácie. V princípe existujú tri typy mutácií – *substitúcia* (nahradenie jedného nukleotidu druhým), *delécia* (vyštiepenie jedného alebo viacerých nukleotidov) a *inzercia* (vsunutie jedného alebo viacerých nukleotidov). Genetické ochorenia sú zapríčinené **mutáciami** v DNA. Gény životného významu netolerujú žiadne mutácie, ktoré by pozmenili, alebo obmedzili ich funkciu. Preto sa tieto mutácie neakumulujú. Všetky živé organizmy majú vyvinutý bunkový záchranný systém, ktorý rozpoznáva a eliminuje chyby

v integrite DNA. V prípade, že oprava DNA nie je možná, organizmus obetuje poškodené bunky cez programovanú bunkovú smrť - apoptózu.

Práve mutácie sú príčinou mnohých závažných geneticky podmienených ochorení. Geneticky podmienené ochorenia rozdeľujeme podľa toho, či sú kódované jedným génom – **monogénne podmienené dedičné ochorenia**, alebo viacerými génmi – **polygénne podmienené dedičné ochorenia**.

Humánna genetika sa zaoberá štúdiom všetkých ľudských génov, normálnych aj abnormálnych. Medicínske aplikácie humánnej genetiky prispievajú k pochopeniu príčin ochorenia, čo vedie k zdokonaleniu poznania príčin ochorenia. V závislosti od rodinnej anamnézy a typu ochorenia, ako aj vplyvu prostredia je možné získať informácie o ochorení, ktoré sa prejaví neskôr. Diagnostika dedičných ochorení vyžaduje systematický prístup, ktorý zohľadňuje viaceré klinické a genetické pohľady. Prvým krokom je analýza fenotypu, t.j. zhodnotenie vonkajších prejavov ochorenia. Druhým krokom je genetická diagnostika. Genetická analýza sa najčastejšie robí polymerázovou reťazovou reakciou (PCR).

METÓDY ŠTÚDIA DNA A RNA

Prenos informácie z DNA je v prvom kroku sprostredkovaný ribonukleovými kyselinami (RNA). RNA je na rozdiel od DNA jednovláknová a namiesto nukleotidovej bázy tymínu, ktorý sa nachádza v DNA, obsahuje uracil.

V súčasnosti existuje viacero metód štúdia DNA. Tieto metódy vyžadujú **denaturáciu** – rozpletenie dvojzávitnice DNA na dve jednovlákná – a **hybridizáciu** – spojenie dvoch vlákien, aby znovu vytvorili dvojvlákno. Techniky, ktoré využívajú kroky denaturácie a hybridizácie sú napr. polymerázová reťazová reakcia (PCR), „dot“ (bodový) blot, Southernov blot, fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH) a komparatívna genómová hybridizácia (CGH). „Dot“ blot je zjednodušená metóda Southern, resp. Northern blotu. Pri

tomto type blotu sa biomolekuly, ktoré sú predmetom detekcie, nedelia chromatograficky, ale zmes biomolekúl sa aplikuje priamo na membránu ako bod, resp. škvrna. Následne sa sledovaná biomolekula stanoví nukleotidovými próbami. CGH je molekulárne-cytogenetická metóda používaná na analýzu počtu zmenených kópií v obsahu DNA.

Izolácia DNA a RNA

Vo všeobecnosti je DNA veľmi stabilná. Na bežné klinické stanovenie DNA sa najčastejšie využíva vzorka krvi. Táto však musí byť odobraná do EDTA a nie do heparínu, pretože tento sa viaže na DNA a zabraňuje jej amplifikácii. V súčasnosti existuje rada komerčných kitov (izolačných súprav), ktoré využívajú fenol-chloroformovú extrakciu na izoláciu DNA. Po prezrážaní s alkoholom sa DNA rozpúšťa v sterilnej vode. Keďže DNA je obrovská molekula, rozpúšťanie trvá dlhšiu dobu. Preto je vhodné rozpúšťať denaturovanú DNA cez noc pri izbovej teplote, alebo pri zvýšenej teplote (37°C). Pri práci s DNA je treba dávať pozor na prítomnosť DNáz, ktoré by danú vzorku poštípili.

Na rozdiel od DNA, RNA je oveľa citlivejšia. V prvom rade je potrebné zvážiť, či potrebujeme celkovú RNA, alebo polyadenylovanú mRNA. RNA potrebná na **reverznú transkripciu** nesmie byť degradovaná ribonukleázami a musí byť odstránená kontaminujúca genómová DNA. Klasickou metódou na izoláciu RNA je **guanídium izotiokyanátová metóda** modifikovaná podľa Chomczynskeho a Sacchiho. V súčasnosti je komerčne dostupné množstvo kitov na izoláciu RNA a mRNA, ktoré sú založené na guanídium izotiokyanátovej metóde. Kvalitu RNA je možné overiť spektrofotometricky, alebo elektroforézou v denaturujúcom géli. Pokiaľ je RNA intaktná, na UV lampe bude vidieť dva rRNA pásy, 28S a 18S, pričom 28S pás bude zhruba dvakrát tak intenzívny, ako pás 18S. Z celkovej RNA je možné ďalej izolovať mRNA na kolónkach s oligo-dT-celulózou, ktorá vycytá mRNA cez

polyadenylovaný koniec mRNA. Tie mRNA, ktoré polyadenylovaný koniec nemajú (napr. mozgové mRNA), sa na oligo-dT-celulóze nezachytia.

Izolovanú RNA je vhodné uchovávať pod etanolom (96%) pri -20°C, alebo pri -70°C. Opakované zmrazovanie a rozmrazovanie môže RNA poškodiť. Na porovnanie sú v Tabuľke 1 sú uvedené výťažky mRNA z jedného gramu tkaniva myši.

Tabuľka 1. Výťažky mRNA z jedného gramu tkaniva myši:

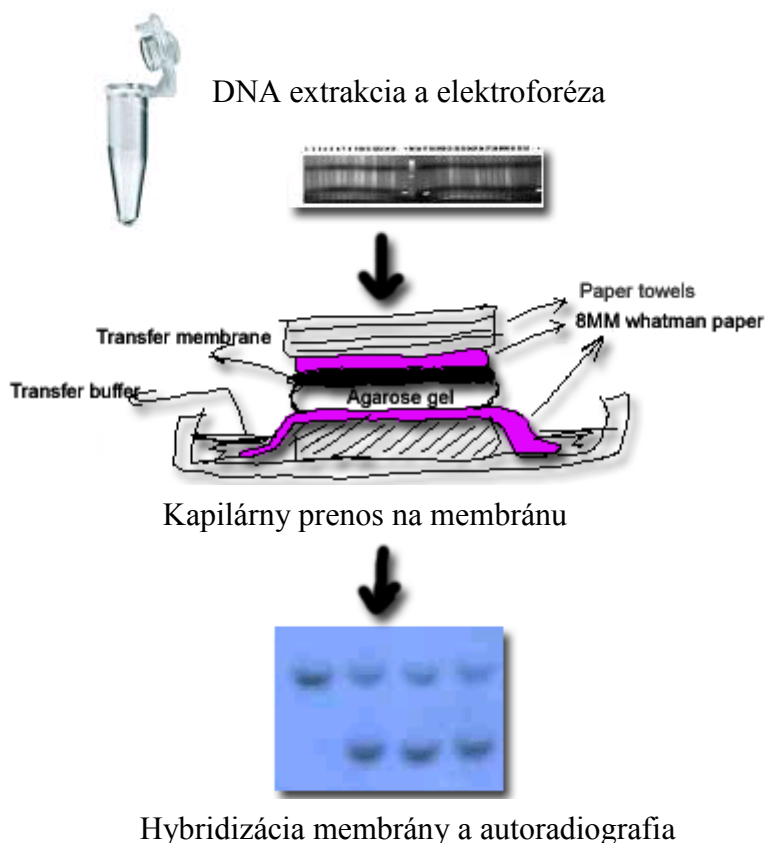
Testes	520 µg
Obličky	360 µg
Pečeň	256 µg
Mozog	180 µg
Tymus	90 µg
Srdce	50 µg
Placenta	50 µg
Plúca	15µg
Koža	5 µg
Sval	menej ako 5 µg

Southernov blot

Táto klasická metóda na štúdium vybraných úsekov DNA bola vyvinutá v roku 1975 Edwinom Southernom. DNA sa poštiepila špecifickými restriktónymi enzýmami, aby vznikli menšie úseky DNA. Vzorka sa naniesla na gél, kde sa fragmenty rozdelili podľa veľkosti. Fragmenty DNA boli následne prenesené (blotované) na nitrocelulóзовú alebo nylonovú

membránu, kde boli zafixované (Obrázok 2). V zásade rozoznávame tri typy prenosu (blotu) z gélu na membránu: suchý blot, kedy sa vzorky prenášajú len difúziou, polosuchý blot, kedy sa fragmenty DNA prenášajú v elektrickom poli medzi dvoma platničkovými elektródami a mokrý blot, ktorý prebieha tiež v elektrickom poli v roztoku bohatom na ióny. Suchý blot sa v súčasnosti nepoužíva, lebo jeho efektivita je veľmi nízka.

Po prenesení na membránu a zafixovaní proteínov sa membrána hybridizuje s denaturovanou a značenou sondou. Je to vlastne syntetický fragment, sekvencia ktorého je komplementárna k sledovanej sekvencii DNA. Po odmytí sondy sa sledované úseky vizualizujú podľa typu značenia próby (Obrázok 2). Nevýhodou tejto metódy je potreba relatívne veľkého množstva DNA (10-20 mikrogramov), veľká prácnosť a zdĺhavosť.



Obrázok 2. Princíp stanovenia DNA pomocou Southern blotu. Prevzaté z <http://biowww.net/>

Polymerázová Ret'azová Reakcia (PCR)

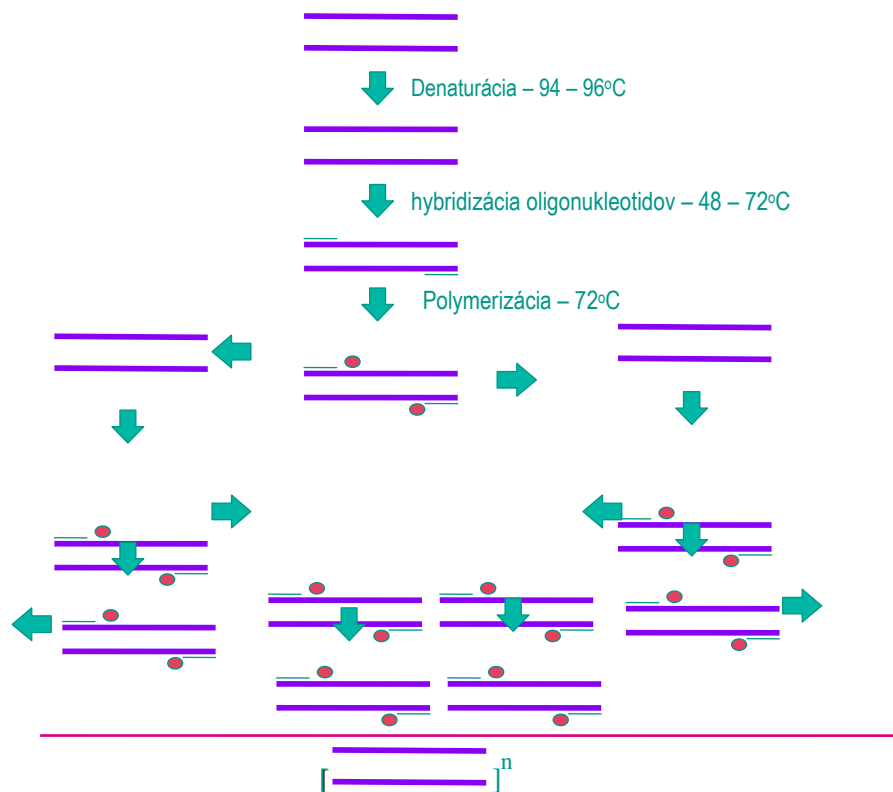
PCR je *in vitro* metóda, ktorá nesporne patrí k prelomovým objavom v molekulárnej biológii. Jej princíp bol objavený v roku 1983. Prvá publikácia s PCR metódou sa objavila v roku 1985. V dnešnej dobe PCR metóda predstavuje základnú techniku pri štúdiu aj diagnostike dedičných ochorení. Patrí tiež k najpoužívanejším metódam v medicínskom a molekulárne-biologickom výskume. V roku 1993 bol objaviteľ tejto metódy, Kary Mullis, ocenený Nobelovou cenou za chémiu.

Princíp PCR

Pomocou PCR metódy je možné namnožiť definovaný úsek DNA z minimálneho množstva DNA (teoreticky z jednej molekuly), pričom sú potrebné len primery - dva krátke syntetické úseky DNA, ktoré sú komplementárne ku 3'-koncom DNA vlákien, na ktoré sa špecificky viažu, ďalej deoxynukleotidtrifosfáty, DNA polymeráza a samozrejme, templátová DNA. Zahriatím templátovej DNA na 95°C sa táto rozpletie (denaturuje) na dve jednotlivé vlákna a umožní primerom naviazať sa (hybridizovať) na komplementárne vlákna DNA. Tento krok prebieha pri teplote 45–70°C, v závislosti od viacerých faktorov. DNA polymeráza potom dosyntetizuje komplementárne DNA vlákna, pričom syntéza začína od 3'-koncev naviazaných primerov. Optimálna teplota pre DNA polymerázu je 37°C. Dnes sa však v PCR používa široká paleta DNA polymeráz z termofilných mikroorganizmov, ktorých teplotné optimum je 72°C. Ich výhoda spočíva v odolnosti voči teplotám denaturácie a preto ich nie je potrebné počas reakcie znova pridávať. V ďalšom kroku slúži novosyntetizovaný produkt ako templát pre ďalšiu reakciu (Obrázok 3). Keďže množstvo DNA kópií sa zdvojuje v každom cykle, po 20 cykloch získame okolo milión kópií pôvodného fragmentu DNA. Každá PCR reakcia sa dá modifikovať tak, aby produkovala čo najväčší výťažok pri vysokej špecificite a citlivosti.

Obmedzenia PCR

- Obmedzením PCR je, že sa nedá amplifikovať úplne neznáma vzorka. Potrebujeme aspoň čiastočne poznať sekvenciu, ktorú chceme amplifikovať, aby sme vedeli navrhnúť potrebné primery.
- Najlepšie a s najmenšími chybami sa amplifikujú malé úseky DNA. Na amplifikovanie dlhších úsekov sú potrebné špeciálne Taq polymerázy.



Obrázok 3. Polymerázová reťazová reakcia sa skladá z troch cyklických krokov – denaturácie, hybridizácie primerov (tzv. „annealing“) a polymerizácie. Tieto tri cykly sa opakujú n-krát.

1. Denaturácia je rozpletenie dvojvláknovej DNA.

2. Hybridizácia oligonukleotidových primerov („annealing“) pre vymedzenie amplifikovaného úseku.
3. Polymerizácia, kedy DNA polymeráza rozoznáva voľné 3'- konce primerov a začne pridávať voľné deoxyribonukleotidy komplementárne s templátovým vláknom. S pribúdajúcimi opakovaniami sú prednostne syntetizované krátke úseky vymedzené primermi.

Príprava vzorky pre PCR

Ako templát pre PCR sa používa buď **genómová DNA**, alebo **komplementárna DNA** (cDNA). Zatiaľ čo genómovú DNA je možné pripraviť priamo, cDNA sa pripravuje z izolovanej RNA reverznou transkripciou.

Heparín, bežne používaný antikoagulant, by sa nemal používať pri odoberaní krvných vzoriek, pokiaľ tieto budú použité na PCR, pretože heparín je silný PCR inhibítor. Aj ďalšie substancie v krvi, pravdepodobne porfyrínové zložky, ktoré sú tiež silné inhibítory PCR, by mali byť odstránené pri izolácii DNA lýzou červených krviniek a centrifugáciou a sedimentáciou bielych buniek. Najčastejším antikoagulantom pre odber krvi pre analýzu DNA je roztok EDTA pH 8,0. Ako zásobný roztok sa používa 0,5 mol/L EDTA a do vzorky krvi sa pridáva v pomere 1 : 10.

Reverzná PCR (RT-PCR)

Schopnosť kvantifikovať transkripčné hladiny špecifických génov má zásadný význam nielen vo výskume štúdia modulácie a funkcie génov, ale aj pri rozvoji niektorých ochorení. Analýza množstva mRNA je častou nevyhnutnosťou aj v klinickej diagnostike. Reverzná transkripcia s následnou polymerázovou reťazovou reakciou (RT-PCR) je najcitlivejšia metóda na detekciu malých množstiev mRNA, ktoré sa často získavajú z veľmi malých

množstiev tkaniva. Pri kontrole génovej transkripcie, kde sekvencia génovej DNA slúži ako templát pre syntézu mRNA, kritickú úlohu zohrávajú viaceré regulačné procesy. Regulačné procesy génovej transkripcie fungujú počas vývoja bunky, diferenciácie, normálnej fyziologickej funkcie bunky a v pozmenenej miere počas patologických stavov. K tradičným metódam štúdia mRNA hladín patria metódy ako Northern blot, RNA dot-slot blot, *in situ* hybridizácia a metóda „RNA protection assay“. Metóda PCR a reverznej transkripcie ponúka ďalšie možnosti štúdia génovej transkripcie. Princíp tejto metódy možno zjednodušene zhrnúť do nasledovných krokov:

- izolácia RNA, ktorá bude slúžiť ako templát pre reverznú transkripciu a syntézu prvého vlákna komplementárnej DNA
- reverzná transkripcia
- PCR
- elektroforetická detekcia

Miera expresie génov môže byť zhruba odhadnutá podľa množstva RNA použitého na prepis do cDNA, množstva cDNA použitého na PCR a množstva PCR cyklov potrebného na generovanie viditeľného pásu na agarózovom géli. Za určitých podmienok je možná čiastočná, alebo úplná kvantifikácia pôvodnej RNA, o čom sa zmienime nižšie.

Reverzná transkripcia

Na prepísanie RNA do cDNA templátu sa používajú dva typy reverznej transkriptázy:

- AMV (avian myoblastosis virus) reverzná transkriptáza a
- MMLV (Moloney murine leukemia virus) reverzná transkriptáza.

Obe tieto transkriptázy majú aj RNázovú aktivitu, pretože sa poštíepi RNA a ostane len cDNA, čo je potrebné pre úspešný priebeh následnej PCR.

Na primovanie (nasadenie primera, ktorý slúži ako začiatok reverznej transkripcie) mRNA pre cDNA syntézu sú možné tri rozdielne spôsoby (Obrázok 4):

- v prvom spôsobe sa použije 3' (antisense) primer
- druhý spôsob využíva oligo dT-primer, ktorý primuje polyA koniec mRNA. Dĺžka oligo dT primerov je spravidla 12-18 nukleotidov. Tento spôsob primovania produkuje menej vedľajších PCR produktov ako náhodné primovanie
- náhodné primovanie využíva krátke oligonukleotidy (spravidla hexaméry), ktoré sa naviažu na určité miesta podľa sekvencie a primujú cDNA syntézu. Tento typ primovania je výhodný hlavne pri dlhších templátoch a pri mRNA s čiastočne degradovaným poly A koncom.

Vo väčšine experimentov sa uskutočňuje prepis prvého vlákna cDNA z populácie celkových cytoplazmatických RNA. V prípade, že hľadáme mRNA, ktorá je vzácna, alebo sa za určitých podmienok exprimuje len vo veľmi nízkych koncentráciách, musíme izolovať mRNA. V opačnom prípade – ak sa príslušných mRNA vyskytuje v bunkách stabilne vysoká hladina – dajú sa tieto použiť ako markery exprese.

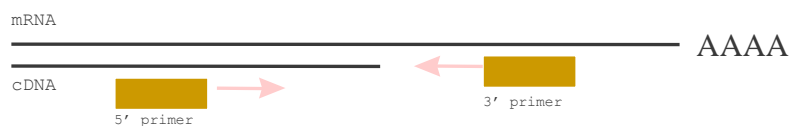
Optimalizácia PCR

Pre úspešný priebeh PCR sú dôležité viaceré faktory, ako :

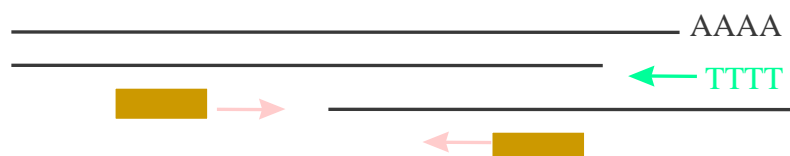
1. vhodný výber a koncentrácia primerov
2. optimalizácia teplôt
3. koncentrácia a typ DNA polymerázy
4. koncentrácia horečnatých iónov a iónová sila roztoku
5. vhodný počet amplifikačných cyklov

6. prídavok aditív

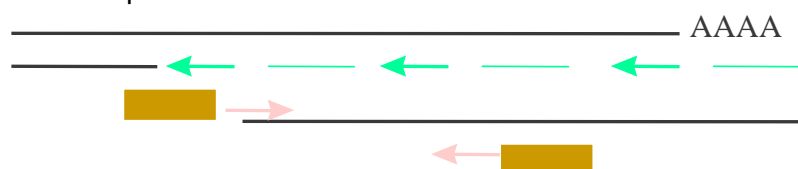
Špecifické primovanie



Oligo (dT) primovanie



Náhodné primovanie



Obrázok 4. Tri základné typy primovania syntézy komplementárneho vlákna DNA (cDNA).

Vhodný výber a koncentrácia primerov

Pri výbere primerov je veľmi dôležité mať na zreteli cieľ, na ktorý chceme PCR využiť. Predovšetkým nie je vhodné vyberať úseky, ktoré sa v genóme často opakujú, lebo tým klesá špecificita reakcie. Pri výbere primerov treba mať na zreteli pomer CG a AT párov. Väzba medzi G a C je energeticky pevnejšia a je ťažšie ju denaturovať, preto by obsah GC párov v primeroch, ani v amplifikovanom úseku nemal presiahnuť 50%. Ďalej treba overiť, aby nebola komplementarita medzi 3' koncami primerov (ináč by sa tvorili diméry a polymeráza by stratila rozpoznávané miesto). Dôležité je tiež zistiť, či daný úsek templátovej DNA nevytvorí internú sekundárnu štruktúru, čo by mohlo znemožniť amplifikáciu. Internú sekundárnu štruktúru tvoria často za sebou opakujúce sa puríny, alebo pyrimidíny.

Optimálna dĺžka primerov je 20-30 báz. Príliš krátke sekvencie nezaručujú špecifitu naviazania, pretože v genóme sa môžu vyskytovať viackrát, zatiaľ čo príliš dlhé primery sa na templátovú DNA viažu ťažko. Sekvencie, ktoré nie sú komplementárne k templátu, sa pridávajú obvykle na 5'-koniec primerov. Takto sa dá zabudovať restriktčné miesto alebo regulačný element, ktorý je priamo inkorporovaný do dvojzávitnice amplifikovaného produktu.

Optimálna koncentrácia primerov je 15 – 50 pmol/l. Vyššia koncentrácia primerov môže zvyšovať akumuláciu nešpecifických produktov, veľmi nízka koncentrácia zase výrazne znižuje výťažok reakcie.

Optimalizácia teplôt

Ako už bolo spomenuté v úvode, na priebeh PCR reakcie sú potrebné tri teploty, ktoré zabezpečujú denaturáciu DNA, špecifické naviazanie primerov na templát a polymerizáciu vlákna. V typickej PCR reakcii sa dvojzávitnicová DNA denaturuje pri 90–95°C, naviazanie primerov prebieha pri 40–60°C a polymerizácia vyžaduje teploty 70–75°C. Teplota hybridizácie primerov závisí od počtu GC párov, dĺžky samotných primerov a koncentrácie solí v reakcii. Pre výpočet tejto teploty sa osvedčil nasledovný empirický vzorec:

$$T = 4 \times (G+C) + 2 \times (A+T) - 4 \text{ C}$$

Čas polymerizácie závisí od dĺžky amplifikovaného fragmentu. Vo všeobecnosti platí, že 1 min pre každú kilobázu je dostačujúca. Ako východisková teplota pre primer, ktorý má 20 bp a GC obsah 50% je vhodná teplota 55°C. Vyššia teplota môže byť vhodná na zvýšenie špecifity reakcie.

Koncentrácia Taq polymerázy

Najčastejšie používaná DNA polymeráza pri PCR je izolovaná z kmeňa *Thermus aquaticus*, preto sa nazýva Taq polymeráza. Pre väčšinu reakcií, je optimálne množstvo Taq polymerázy 0,5 – 1,0U. V určitých špeciálnych reakciách je však potrebné použiť až 5U na reakciu. Je dôležité si uvedomiť, že zvýšená koncentrácia enzýmu môže viesť k zníženiu špecificity reakcie.

Koncentrácia MgCl₂

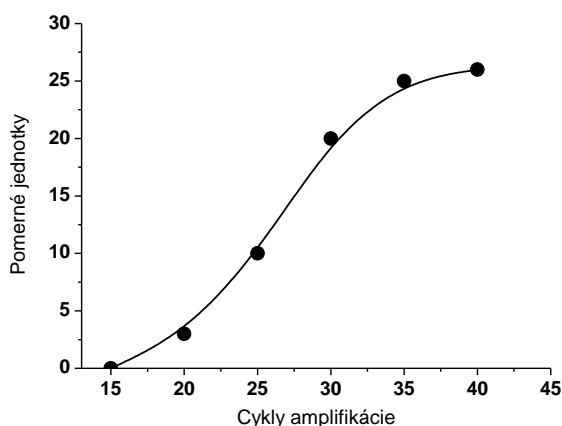
Optimálna koncentrácia horčíka je potrebná na optimálnu funkciu Taq polymerázy. Koncentrácia voľného horčíka, ktorý je kofaktorom pre všetky DNA polymerázy, závisí od koncentrácie látok, ktoré viažu tento ión, ako sú EDTA, dNTP, pyrofosfát a iné.

Počet amplifikačných cyklov

Optimálny počet cyklov je 25-35 (Obrázok 5). Zvýšenie počtu cyklov indukuje akumuláciu nešpecifických produktov PCR. Pokiaľ by sme daný úsek potrebovali amplifikovať na viac cyklov, musíme použiť tzv. „seminested“, alebo „nested“ PCR (nest = hniezdo). Princíp týchto PCR je v tom, že sa odoberie časť produktu po prvej amplifikácii a táto slúži ako templát pre druhú amplifikáciu. Je však potrebné použiť jeden („seminested“) alebo oba („nested“) primery odlišné od pôvodných primerov. Tieto primery sa samozrejme musia nachádzať vo vnútri amplifikovaného fragmentu.

Prídavok aditív

Niektoré chemické látky uľahčujú denaturáciu DNA a zvyšujú efektivitu PCR. Medzi takéto látky patrí dimetylsulfoxid (používa sa 5-10%), glycerol (používa sa 5-10%), alebo formamid (1-5%). Väčšie množstvá týchto látok však znižujú enzýmovú aktivitu.



Obrázok 5. Priebeh amplifikácie fragmentov DNA. Optimálne pribúdanie amplifikovaných fragmentov nastáva medzi 25 -30-tým cyklom amplifikácie. Takéto kalibračné krivky je vhodné spraviť pred každým stanovením mRNA metódou RT-PCR. Keďže množstvo mRNA sa v jednotlivých tkanivách môže líšiť, je potrebné urobiť kalibračnú krivku nielen pre jeden set primerov, ale aj pre každé použité tkanivo.

DNA polymerázy

Taq polymeráza

Taq polymeráza je izolovaná z kmeňa termofilnej baktérie *Thermus aquaticus*. Je to polypeptid s relatívnou molekulovou hmotnosťou približne 95 000 Da. Patrí medzi vysoko účinné 5' – 3' Taq polymerázy, avšak nemá 3' – 5' exonukleázovú aktivitu. pH optimum tohto enzýmu je okolo pH 9,0 a teplotné optimum sa nachádza okolo 72°C. Pri 100°C sa Taq polymeráza inaktivuje do 10 min. pri 95°C je tento čas oveľa dlhší. Taq polymeráza vyžaduje pre svoju optimálnu funkciu kofaktor Mg^{2+} ióny vo forme $MgCl_2$.

Tth polymeráza

Tth polymeráza je izolovaná z kmeňa termofilnej baktérie *Thermus thermophilus*. Jej vlastnosti sú veľmi podobné vlastnostiam Taq polymerázy, navyše má aj aktivitu reverznej

transkriptázy. Táto aktivita nie je spojená s aktivitou RNázy H. Enzým RNáza H je nešpecifická endonukleáza a katalyzuje štiepenie RNA hydrolytickým mechanizmom.

V súčasnosti sa používa veľké množstvo klonovaných a upravených termostabilných polymeráz. Jednou z nich je aj Stoeffelov fragment Taq polymerázy, ktorého výhodou je, že prednostne rozoznáva kratšie fragmenty DNA a umožňuje tak prednostnú amplifikáciu špecifických produktov.

Faktory, ktoré ovplyvňujú špecificitu PCR

PCR a jej špecificitu ovplyvňuje množstvo faktorov. Najdôležitejšie z nich sú zhrnuté v nasledovných bodoch:

1. Templát musí byť čo najčistejší. Čím čistejší je templát, tým menšia je možnosť tvorby artefaktov. Čistota, ako aj množstvo nukleových kyselín sa meria spektrofotometricky.

Nukleové kyseliny absorbujú svetlo pri určitých vlnových dĺžkach. Pre DNA aj pre RNA je maximálna absorbcia pri 260 nm. Táto vlnová dĺžka sa využíva pri stanovení koncentrácie podľa nasledovných vzorcov:

pre ssDNA:

$$\text{konc}(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 37 \mu\text{g/ml} \times \text{faktor riedenia}$$

pre dsDNA:

$$\text{konc}(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{faktor riedenia}$$

pre ssRNA:

$$\text{konc}(\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{faktor riedenia}$$

Pre krátke oligonukleotidy platí, že $A_{260} = 1,000$ zodpovedá koncentrácii 20 – 30 $\mu\text{g/ml}$.

Vyššie uvedená fotometrická metóda je vhodná pre purifikované nukleové kyseliny. Pomer medzi DNA, RNA a proteínmi vo vzorke však nie je možné touto metódou stanoviť, pretože všetky uvedené látky absorbujú pri 260 nm. Niektoré komponenty tlmivých roztokov tiež ovplyvňujú absorbanciu pri vlnovej dĺžke 260 nm. Typickým príkladom je EDTA v koncentrácií už 10 nmol/L. Kontaminácia fenolom zase zapríčiňuje nárast absorbancie pri 280 nm, čím sa znižuje pomer 260/280, ktorý nám indikuje čistotu vzorky. Optimálne hodnoty pomeru 260/280 sú v rozmedzí 1.8-2.0

1. minimalizovanie inkubačných časov počas naviazania primerov a polymerizácie zníži možnosť nešpecifických amplifikácií
2. zníženie koncentrácie primerov a Taq polymerázy tiež prispeje k zvýšeniu špecificity
3. optimalizácia chloridu horečnatého a KCl v reakčnom tlmivom roztoku zvyšuje špecificitu PCR.

Problémy s PCR

Vo všeobecnosti platí, že PCR neprebíha, ak niečo nie je poriadku s východiskovým materiálom - (genómová DNA, cDNA, RNA), s primermi, alebo s DNA polymerázou. Najčastejšie príčiny neúspechov PCR sú zosumarizované v nasledovných bodoch:

- templát nie je dostatočne purifikovaný
- templát je degradovaný
- templát má príliš nízku koncentráciu
- v templáte sa nachádzajú zvyšky fenolu
- koncentrácia horčíka nie je optimálna
- Taq polymeráza je málo aktívna, alebo inaktívna
- Teplota „annealingu“ je príliš nízka, alebo vysoká.

Účinnosť PCR amplifikácie

PCR amplifikácia je exponenciálny proces, preto malé odchýlky v reakcii môžu výrazne zmeniť výťažok produktov. Účinnosť PCR reakcie sa tiež znižuje vo vyšších fázach amplifikácie, a to hlavne v dôsledku vyčerpania jednotlivých reakčných komponentov, zníženiu enzymatickej aktivity a akumulácii produktov. Preto je dôležité analyzovať produkty PCR iba počas exponenciálnej fázy amplifikácie.

Množstvo PCR produktov narastá exponenciálne do koncentrácie zhruba 10^{-8} mol/L, potom lineárne do koncentrácie 10^{-7} mol/L. Množstvo PCR produktu je proporcionálne koncentrácii východiskovej cDNA.

Pri reverznej transkripcii a následnej PCR môže vzniknúť falošný signál, pôvodcom ktorého je genómová DNA. Veľmi rizikovým faktorom je voľba primerov v rámci jedného exónu, t.j. bez prítomnosti intrónu. Preto je veľmi vhodné používať primery, ktoré sa nachádzajú na rozdielnych exónoch, takže výsledný produkt z kontaminujúcej genómovej DNA je oveľa väčší ako produkt z cDNA templátu. Genómová DNA tiež môže byť eliminovaná z RNA vzoriek opracovaním DNázou, ktorá nesmie mať RNázovú aktivitu.

Aplikácie PCR

PCR genómovej DNA

Táto metóda sa využíva najviac pri konštrukcii genómových knižníc menej komplexných genómov, ako sú baktérie a vírusy. Genómová DNA sa poštiepi restričnou endonukleázou, ktorá tvorí fragmenty o veľkosti, ktorá je vhodná na klonovanie. Tieto fragmenty sa potom amplifikujú v zmesi s náhodne generovanými primermi, ktoré obsahujú adaptér so začleneným asymetrickým restričným miestom, komplementárnym k vektoru. Po štiepení tohto miesta je možné zmes fragmentov priamo ligovať s vektorom.

RACE-PCR („Rapid Amplification of cDNA ends“)

Túto metódu vyvinuli v r. 1988 Frohman a spolupracovníci. Umožňuje nielen klonovať, ale aj doplniť nekompletné cDNA klony či už na 5', alebo na 3' konci. Zároveň je rýchlou alternatívou k nezáživnému a zdĺhavému skrínovaniu cDNA knižníc. Princíp spočíva v tom, že podľa toho, ktorý koniec chceme doplniť, syntetizujeme pre transkript špecifickú cDNA (5'-RACE), alebo pomocou oligo-dT primeru cDNA špecifickú pre mRNA. K transkriptu špecifickej cDNA pri 5'-RACE metóde musíme ešte pridať na 5'-koniec molekuly poly (A) sekvenciu. Táto sekvencia bude v ďalších PCR reakciách rozoznávaná všetkými oligo-dT primermi.

3'- RACE metóda umožňuje doplniť nekompletné sekvencie na 3' konci cDNA. Oproti predošlej metóde má však tú nevýhodu, že ju môžeme použiť iba v prípade eukaryotických polyadenylovaných mRNA.

SNuPE (Single Nucleotide primer Extension)

Touto metódou je možné identifikovať a kvantifikovať alelické varianty DNA alebo RNA, ktoré sa môžu líšiť iba jedným nukleotidom. Meranie spočíva v enzýmovom predĺžení primera, ktorý hybridizuje v blízkosti rozdielneho nukleotidu („mismatch“). V prítomnosti rádioaktívne alebo fluorescenčne značeného dNTP tak vzniká značený produkt, ktorý je možné kvantifikovať.

Klonovanie PCR produktov.

Najjednoduchším prípadom klonovania produktov PCR je ten, ak sme ukončili reakciu a adaptorovými primermi, obsahujúcimi restriktčné miesto. Pri štiepení PCR produktu tak môžeme dostať kohézne, alebo tupé konce, vhodné pre priame ligovanie s vektorom. Tento ideálny prípad môže nastať iba vtedy, ak vopred poznáme sekvenciu nášho produktu a podľa

nej vieme zvoliť aj univerzálne restriktčné miesto v adaptore, bez rizika, že si poštiepime aj samotný produkt. Ak chceme klonovať neznámu sekvenciu alebo zmes rôznych PCR fragmentov (konštrukcia knižnice), je vhodné zvoliť univerzálnejší postup. Jedným z problémov PCR produktov je, že Taq polymeráza má aj slabú deoxynukleotidyl-transferázovú aktivitu a pridáva na 3'-koncoch produktu 3-6 adenínov („A-overhang“). Preto ak chceme produkt PCR priamo klonovať, musíme buď tieto adeníny selektívne odstrániť, alebo pridať komplementárnych 3-6 tymínov k vektoru, s ktorým budeme produkty ligovať. Vzhľadom k tomu, že pre tieto reakcie je potrebné veľmi kvalitne a presne titrovať podmienky, odporúčame využiť komerčne dostupné, veľmi kvalitné súbory pre klonovanie PCR produktov. Dosiahneme s nimi zaručene vysokú účinnosť ligácie.

Riadená mutagenéza pomocou PCR

In vitro riadenou mutagenézou zavádzame do sekvencie DNA jednoduché alebo viacnásobné zámény nukleotidov, delécie, inzercie a pod. Tieto metódy sú nevyhnutnou súčasťou štúdia funkcie proteínov a regulačných oblastí DNA. Oproti iným, klasickým, metódam mutagenézy, má PCR výhodu v tom, že po zavedení ľubovoľnej mutácie sa tvoria len presné kópie mutovanej DNA. Mutáciu môžeme zaviesť jedným z dvojice primerov, ktorý nesie mutované miesto buď do lineárneho fragmentu DNA a tento potom klonovať, alebo ju môžeme uskutočniť priamo na príslušnom replikóne (napr. plazmide) a zaistiť tak priamo jej replikáciu v bunke. Metódu možno rozdeliť na dva základné kroky:

Krok 1-amplifikácia : Amplifikujeme dva separátne fragmenty plazmidu:

Fragment I (na amplifikáciu použijeme primery 1 a 2), fragment II (amplifikácia je primovaná primermi 3 a 4). 5'- konce primerov 1 a 4 sú lokalizované distálne od restriktčných miest A a C. Primer 3 nesie mutáciu v podobe „mismatchu“ (M). 5'-konce primerov 2 a 3 sú zvolené tak , aby po ligácii dvojitých produktov PCR tvorili želanú sekvenciu.

Krok 2-ligácia: Plazmid štiepime enzýmami A a C. Rovnako štiepime amplifikované fragmenty I a II, ligujeme ich so štiepeným plazmidom (fragment III). Pre kompletnú ligáciu musia byť 5' - konce primerov 2 a 3 fosforylované.

Sekvenovanie PCR produktov

V súčasnosti existuje množstvo protokolov pre priame sekvenovanie PCR produktov. Rovnako existujú komerčne dostupné súbavy, ktoré zabezpečujú vysokú efektivitu práce. Ak prevedieme pri amplifikácii tzv. **symetrickú PCR**, kedy v zmesi máme PCR-primery približne o rovnakej molarite (látkovej koncentrácii), výsledkom je určité množstvo dvojvláknového produktu. Pri **asymetrickej PCR** sa obvykle použije v reakčnej zmesi 100-násobne menej jedného z primerov, čo umožní jeho rýchle vyčerpanie v zmesi a prevažnú produkciu jednovláknovej DNA. Nakoľko nie je možné celkom presne kontrolovať takýto nepravidelný priebeh reakcie, bývajú výsledky sekvenovania takýchto produktov ťažšie čitateľné. Lepším systémom je ten, ktorý využíva pri amplifikácii dvojvláknovej DNA primery, z ktorých je jeden fosforylovaný. Následne sa dá využiť selektívne pôsobenie enzýmu – lambda exonukleázy - ktorý odbúra iba vlákna amplifikované s fosforylovaným primerom.

Účinnosť PCR amplifikácie

PCR amplifikácia je exponenciálny proces, preto malé odchýlky v reakcii môžu výrazne zmeniť výťažok produktov. Účinnosť PCR reakcie sa tiež znižuje vo vyšších fázach amplifikácie, a to hlavne v dôsledku vyčerpania jednotlivých reakčných komponentov, zníženiu enzymatickej aktivity a akumulácii produktov. Preto je dôležité analyzovať produkty PCR iba počas exponenciálnej fázy amplifikácie.

Množstvo PCR produktov narastá exponenciálne do koncentrácie zhruba 10^{-8} mol/l, potom lineárne do koncentrácie 10^{-7} mol/L. Množstvo PCR produktu je proporcionálne koncentrácii východiskovej cDNA.

Pri reverznej transkripcii a následnej PCR môže vzniknúť falošný signál, pôvodcom ktorého je genómová DNA. Veľmi rizikovým faktorom je voľba primerov v rámci jedného exónu, t.j. bez prítomnosti intrónu. Preto je veľmi vhodné používať primery, ktoré sa nachádzajú na rozdielnych exónoch, takže výsledný produkt z kontaminujúcej genómovej DNA je oveľa väčší ako produkt z cDNA templátu. Genómová DNA tiež môže byť eliminovaná z RNA vzoriek opracovaním DNázou, ktorá nesmie mať RNázovú aktivitu.

Ďalšie metódy štúdia génovej expresie

Prepis informácie z génu do mRNA sa nazýva **transkripcia**. Jednotlivé bunky prepisujú len tie gény, ktoré sú pre ich život a funkcie potrebné. Pri kontrole génovej transkripcie, kde sekvencia génovej DNA slúži ako templát pre syntézu mRNA, kritickú úlohu zohrávajú viaceré regulačné procesy. Transkripcia génov je proces závislý **na veku bunky**, ako aj na vonkajších a vnútorných faktoroch (rozvoj patologického stavu, obrana bunky, riadená bunková smrť – apoptóza, atď.). Regulačné procesy génovej transkripcie teda fungujú počas vývoja bunky, diferenciácie, normálnej fyziologickej funkcie bunky a v pozmenenej miere počas patologických stavov. K tradičným metódam štúdia mRNA hladín patria metódy ako Northern blot, in situ hybridizácia, „RNA protection assay“ a v súčasnosti veľmi často používaná metóda reverznej transkripcie a následnej polymerázovej reťazovej reakcie .

Northern blot analýza

Táto metóda patrí k prvým metódam štúdia génovej expresie, je však pomerne málo citlivá. Pomenovaná bola ako recesia k už existujúcemu Southernovmu blotu, s ktorým je veľmi

podobná. Princípom tejto metódy je rozdelenie RNA v denaturačnom agarózovom géli (v prítomnosti formaldehydu), prenesenie na nitrocelulózovú membránu a hybridizácia so selektívnou próbou. Najčastejšie boli próby značené radioaktívne, v súčasnosti sa využíva fluorescencia a emisia svetla.

„RNA protection assay“

„RNA protection assay“ je metóda, ktorá využíva fakt, že RNázy sú schopné degradovať len jednovláknovú RNA. Na sledovaný úsek sa naviaže špecifická próba, ktorá ochráni sledovanú RNA pred poštiepením RNázami, ktoré však poštiepia ostatné, nechránené jednovláknové RNA v roztoku. Podobne ako pri Northern blote, RNA próba bola radioaktívne značená, čo umožňovalo jej detekciu na géli.

Reverzná transkripcia s následnou PCR (RT-PCR)

Ako už bolo spomenuté, RT-PCR je vlastne obyčajná PCR, ktorej predchádza **reverzná transkripcia**. Schopnosť kvantifikovať transkripčné hladiny špecifických génov má zásadný význam nielen vo výskume štúdia modulácie a funkcie génov, ale aj pri rozvoji niektorých ochorení. Analýza množstva mRNA je časťou nevyhnutnosťou aj v klinickej diagnostike. Reverzná transkripcia s následnou polymerázovou reťazovou reakciou (RT-PCR) je najcitlivejšia metóda na detekciu malých množstiev mRNA, ktoré sa často získavajú z veľmi malých množstiev tkaniva. Metóda PCR a reverznej transkripcie ponúka ďalšie možnosti štúdia génovej transkripcie. Princíp tejto metódy možno zjednodušene zhrnúť do nasledovných krokov:

- izolácia RNA, ktorá bude slúžiť ako templát pre reverznú transkripciu a syntézu prvého vlákna komplementárnej DNA (cDNA)
- reverzná transkripcia

- PCR
- elektroforetická detekcia

Miera expresie génov môže byť zhruba odhadnutá podľa množstva RNA použitého na prepis do cDNA, množstva cDNA použitého na PCR a množstva PCR cyklov potrebného na generovanie viditeľného pásu na agarózovom géli. Za určitých podmienok je možná čiastočná, alebo úplná kvantifikácia pôvodnej RNA.

Pre kvantifikáciu množstva exprimovaného génu sa používajú referenčné, tzv. „housekeeping genes“ – gény kódujúce proteíny, ktoré sú zásadné pre život bunky. Od ich prepisu závisí bazálna metabolická aktivita bunky. Expresia týchto génov je relatívne konštantná, preto je možné ich použiť na kvantifikáciu génovej expresie iných génov. Takáto kvantifikácia je vždy **relatívna**, pretože závisí od viacerých faktorov. Tiež existuje možnosť, že niektorý „housekeeping gene“ sa vplyvom niektorých stimulov môže meniť (napr., GAPDH pri ischémii). V Tabuľke č.2 sú popísané niektoré referenčné „housekeeping“ gény, ich funkcia a veľkosť ich mRNA.

Tabuľka 2. Najčastejšie používané referenčné „housekeeping“ gény

<i>Housekeeping genes</i>	<i>funkcia</i>	<i>veľkosť mRNA-kb</i>
β-aktín	cytoskeletálny proteín	1,76
glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza (GAPDH)	glykolýza	1,27
ubiquitín	degradácia proteínov	2,30
α-tubulín	cytoskeletálny proteín	1,59
fosfolipáza A	lipidový metabolizmus	2,80
ribosomálny proteín S9	proteínová syntéza	0,69
Transferínový receptor	vtok železa	5,10

Kvantifikácia RT-PCR

Kvantifikácia produktov PCR a RT-PCR reakcií nadobudla zásadný význam hlavne v diagnostike onkologických ochorení, alebo pri diagnostike infekčných chorôb. V mnohých

prípadoch je totiž zásadným problémom aktivácia transkripcie onkogénov, alebo stanovenie počtu patogénov. Metóda, ktorá sa na to vyžíva, sa volá **PCR v reálnom čase** - „**real-time**“ **polymerázová reťazová reakcia**, alebo tiež kvantitatívna „real-time“ polymerázová reťazová reakcia (Q-PCR/qPCR/qrt-PCR). Umožňuje merať amplifikovanú DNA priebežne v procese reakcie, teda v reálnom čase, na rozdiel od bežnej PCR, kde sa produkt meria až na konci reakcie. Dve najčastejšie varianty tejto metódy sú :

A - nešpecifické fluorescenčné farbivo sa interkalačne zabuduje do amplifikovaného reťazca DNA. Najčastejšie sa používa SYBR Green, ktorá po zabudovaní do dvojzávitnice vysiela fluorescenčný signál a teda je možné merať množstvo amplifikovaného produktu. Špecifitu reakcie je nutné merať tzv. „melting“ (melt = roztopiť, roztaviť) analýzou.

B - použije sa sekvenčne špecifická oligonukleotidová próba nesúca fluorescenčné značenie, ktoré je možné stanoviť iba po hybridizácii s komplementárnym amplifikovaným fragmentom DNA (Obrázok 6). V praxi sa často používajú na próbach naviazané aj tzv. zhášače (quencher) fluorescencie. Takto značené próby sa nazývajú Taqmanove próby, hybridizujú na DNA vnútri amplifikovaného úseku a majú na jednom konci naviazanú fluorescenčnú farbičku, zatiaľ čo na druhom konci je naviazaný zhášač. Pokiaľ je próba naviazaná na DNA, fluorescenčné farbivo sa nachádza v blízkosti zhášača, ktorý ruší jej signál. Pri PCR amplifikácii próba oddisociuje od DNA, vzdialenosť medzi farbivom a zhášačom sa zväčší a farbička začne vysielať signál.

Často sa „real-time“ PCR kombinuje s reverznou transkripciou, čím sa dá vlastne kvantifikovať východisková mRNA a nekódujúce RNA v bunkách alebo tkanivách.

Využitie princípu metódy PCR

Náhodne amplifikovaná polymorfná DNA - „Random Amplified Polymorphic DNA“ (RAPD)

RAPD analýza umožňuje porovnať stovky DNA vzoriek za deň. Táto technika porovnáva genómové polymorfizmy pomocou krátkych oligonukleotidových primerov pre arbitrárne sekvencie v genóme. RAPD metóda má široké použitie, a to hlavne pri mapovaní génov, detekcii kmeňových odlišností, populačnej analýze, epidemiológii a pri stanovení fylogenetických a taxonomických príbuzností, resp. odlišností. RAPD metóda je tiež použiteľná u tých organizmov, kde nie je doteraz známa sekvencia genómu.

Primery pre RAPD by mali mať dĺžku 7-15 báz. Treba si uvedomiť že primery s rozdielnou dĺžkou môžu dať produkty rozdielnych veľkostí pri tej istej DNA. Rozdielne koncentrácie primerov tiež ovplyvňujú profil RAPD reakcie. Napríklad, vysoké koncentrácie primerov majú za následok prednostnú amplifikáciu nízkomolekulových produktov, zatiaľ čo nízke koncentrácie primerov amplifikujú prednostne produkty s vyššou veľkosťou.

Analýza mikrosatelitov

Mikrosatelity sú polymorfné tandemové opakovania krátkych sekvencií rozšírených po celom genóme. **Genotypovanie** pomocou týchto sekvencií je súčasťou mnohých moderných diagnostických metód. Napríklad sa zistilo, že v nádorových bunkách sa stráca presnosť replikácie týchto sekvencií (mikrosatelitová nestabilita) a vznikajú viacnásobné alely. Tie sa využívajú ako markery nádorových buniek.

V každej DNA sa nachádza súbor vysoko variabilných (hyper-variabilných) oblastí. Tieto sú tvorené rôznym počtom tandemových opakovaní určitého sekvenčného motívu a dajú sa dekovat' ako *polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov* (RFLP) Táto hypervariabilná oblasť, ktorá obsahuje tandemové opakovania a predstavuje iba jeden lokus, nazýva sa **VNTR** (variable number of tandem repeats) a **STR** (short tandem repeats). Dĺžka opakovanej

sekvencie je najčastejšie 2- 100 bp a počet opakovaní je od jednej do niekoľko sto. Na rozdiel od ostatnej genómovej DNA u cicavcov , sú tieto sekvencie bohaté na GC páry (60%).

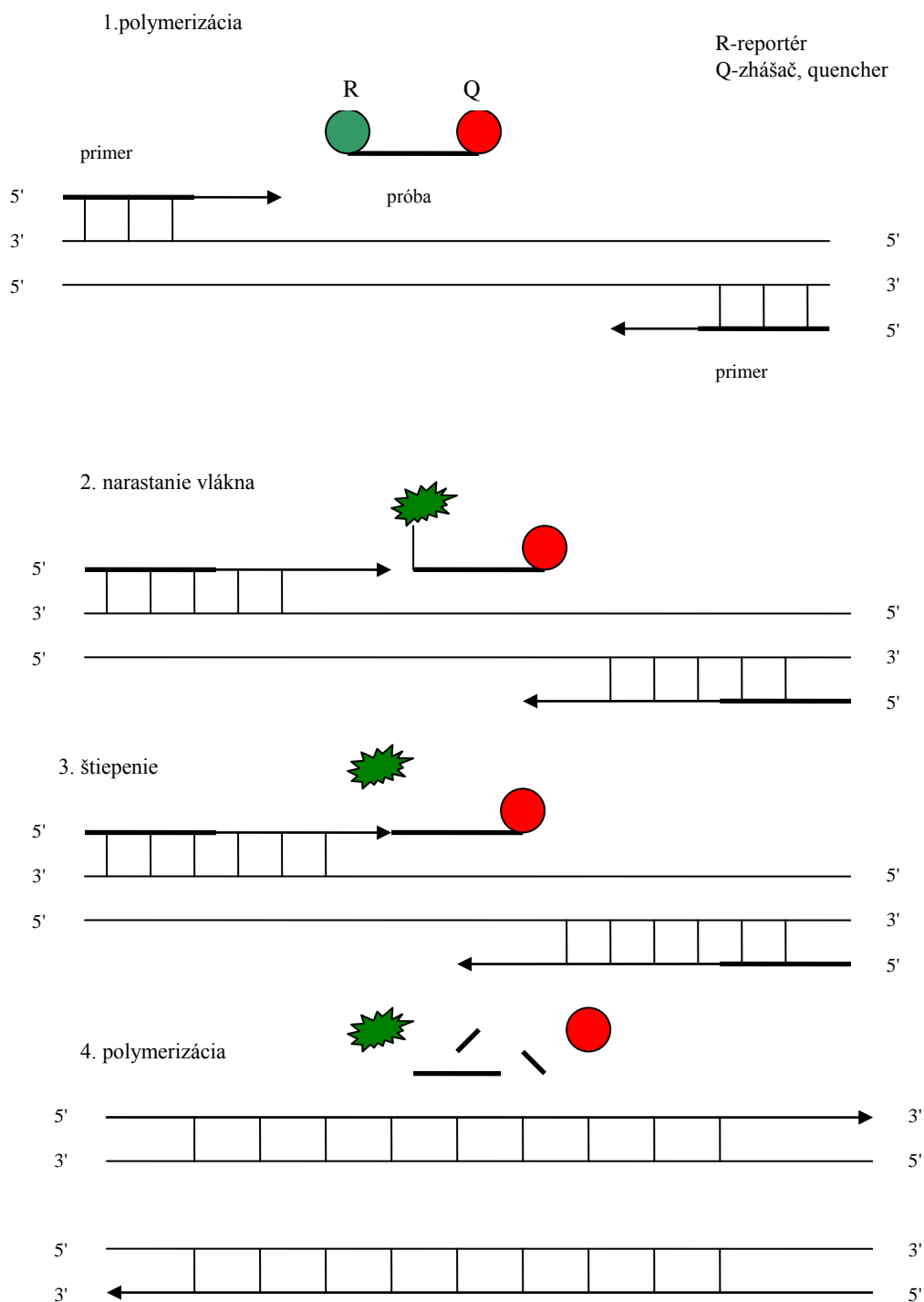
Čiastočne majú tieto sekvencie využitie pri väzbových štúdiách a pri genetickom mapovaní. Výsledkom genetického mapovania pomocou repetitívnych sekvencií je individuálny genetický odtlačok prstov „*DNA fingerprint*“.

„Differential polymerase chain reaction“ – DIFF PCR

DIFF PCR je metóda, ktorá umožňuje simultánnu amplifikáciu DNA a homologických RNA v jednej reakcii. V zmesi DNA a RNA, sa DNA fragment amplifikuje pomocou „sense“ a „antisense“ primerov . RNA sa najprv prepíše s primerom, ktorý sa nachádza bližšie k 5 – koncu cDNA než pôvodný antisense primer. cDNA je viacnásobne amplifikovaná a dáva fragment menšej veľkosti, než vzniká pri DNA amplifikácii. Kvantifikáciou relatívnych množstiev amplifikovanej RNA a homologickej DNA je možné stanoviť transkripčnú rýchlosť definovaného DNA fragmentu. Preto je DIFF PCR veľmi vhodná nielen pre monitorovanie génovej expresie, ale tiež pre štúdium génovej regulácie a génovej funkcie.

Využitie PCR

PCR ako jednoduchá, spoľahlivá a rýchla metóda má využitie v najrozmanitejších oblastiach skúmania živých systémov. Za zmienku stojí využitie pri detekcii ochorení človeka a hospodársky významných druhov zvierat a rastlín (geneticky podmienené ochorenia a znaky, nádorové a infekčné ochorenia) a to aj na úrovni prenatálnej diagnostiky a vo forenznej medicíne. Rýchle uplatnenie našla metóda PCR v živočíšnej a rastlinnej výrobe (detekcia kmeňových a druhových odlišností, paternita, populačná analýza, atď.) potravinárstve (identifikácia surovín, prítomností patogénov) a v mnohých ďalších odvetviach.



Obrázok 6. „Real-time“ PCR s fluorescenčne značenou próbou a zhášačom. R-reportér, Q-„quencher“, zhášač

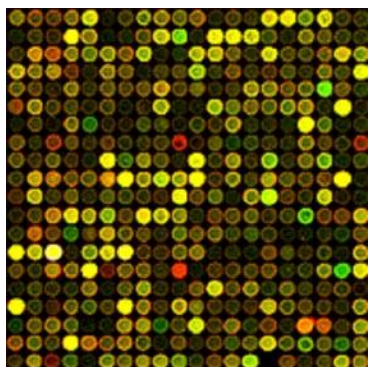
Mikročipová analýza („MICROARRAY“)

V súčasnosti je známe, že mnohé ochorenia majú tzv. polygénny základ. Na ich vzniku sa podieľajú viaceré gény, ktoré môžu obsahovať rôzne polymorfizmy, alebo je ochorenie podmienené zmenenou expresiou viacerých génov zaradených do určitého metabolického cyklu. V takýchto prípadoch bolo potrebné hľadať spôsoby, akými sa dá rýchlo a efektívne monitorovať buď transkripcia alebo priamo expresia mnohých génov v jednej vzorke. To viedlo k vývoju techniky „microarray“ (mikrozoskupenia, mikročipy; Obrázok 7). Základom je čip – sklenená platnička, alebo tenkovrstvový silikónový film, na ktorý sa presným spôsobom strojovou raznicou („spotter“) nanesú a imobilizujú kruhové kvapky oligonukleotidových sekvencií („spots“). Pre výsledok je dôležité aby tieto kvapky mali presný ohraničený tvar a polohu. Princípom je potom hybridizácia medzi dvomi komplementárnymi úsekmi vlákien nukleových kyselín. Komplementárne nukleotidové sekvencie sa spájajú vodíkovými mostíkmi. Vytvárajú tak nekovalentnú väzbu. Po odmytí nenaviazaných sekvencií zostávajú vo vzorke iba tie, ktoré vytvorili dostatočne silnú väzbu s oligonukleotidovou próbou na čipe (tzv. stringencia väzby). Ak sú potom cieľové sekvencie označené fluorescenčne – najmenej 2 značkami s emisiou v oblasti rozdielnej vlnovej dĺžky, vzniká signál, ktorého intenzita je závislá od sily väzby a od množstva templátu. Prekrytím a vyhodnotením signálov v dvoch rozdielnych vlnových dĺžkach umožňuje pomerne presnú kvantifikáciu signálu. Usporiadanie čipu a následná hybridizácia môžu byť rôzne DNA/DNA, DNA/RNA, RNA/RNA a dnes sa už začínajú využívať aj tzv. proteínové čipy, kde sú imobilizované špecifické protilátky proti niektorým proteínom. Možnosť sledovať stovky signálov v jednej vzorke spôsobili, že technika mikročipov sa stala metódou dnes už značne využívanou v diagnostike.

Uplatnenie PCR v medicínskej praxi

Skoré rozpoznanie geneticky podmienených ochorení má význam nielen terapeutický, ale tiež ekonomický. Geneticky podmienené ochorenia sa delia na **monogénne dedičné** (podmienené poruchou v 1 gène), alebo **polygénne podmienené** (súbor génov). Príčinami monogénne dedičných ochorení sú:

- delécia malých (1-200 bp), alebo veľkých úsekov DNA
- mutácie bodové, alebo zámeny celých kodónov
- inzercia celých úsekov DNA (translokácie), alebo expanzie tripletov



Obrázok 7. Ukážka výsledku „mikroarray“ analýzy. Rozdielna farba fluorescenčného signálu zodpovedá rôznej špecificite a intenzite kvantite väzby.

Typickým príkladom **monogénne dedičného** ochorenia je cystická fibróza, kde je 50-60% prípadov zapríčinených **deléciami**, Duchennova svalová dystrofia (60% ochorení spôsobujú delécie, 30% substitúcie a 10% iné poruchy sekvencie DNA), alebo Huntingtonova chorea, charakterizovaná vnútornými expanziami génu.

Ako príklad **polygénneho** ochorenia môže slúžiť hypertenzia. Gény ,ktoré by mali participovať na vzniku a vývoji tohto ochorenia sa nazývajú „**kandidátne gény**“. Pretože pri polygénnych ochoreniach je veľmi zložitá objasniť mieru genetickej zmeny vedúcej k rozvoju ochorenia, hľadajú sa v prvom kroku **polymorfizmy**, ktoré by mohli byť asociované, alebo

viazané s daným ochorením. ***Polymorfizmus je génová mutácia, ktorá sa vyskytuje v ľudskej populácii s incidenciou vyššou ako 1%.*** Rozdielne polymorfizmy sa dajú odlíšiť po PCR buď priamo na základe odlišných veľkostí PCR produktov (typickým príkladom je inzerčno-delečný I/D polymorfizmus na gène, ktorý kóduje angiotenzín konvertujúci enzým), alebo po štiepení vhodným restriktčným enzýmom.

Na rozvoji polygénnych ochorení sa podieľajú mnohé genetické a environmentálne rizikové faktory. Napríklad, pre vznik kardiovaskulárnych ochorení (KVO), ako sa všeobecne nazývajú choroby srdca a cievneho aparátu patria k environmentálnym faktorom fyzická aktivita, strava, alkohol, drogy, fajčenie a stres. Genetická predispozícia je zapríčinená mutáciami a polymorfizmami v množstve génov, ktoré sú najčastejšie spojené s koaguláciou krvi, reguláciou krvného tlaku a s metabolizmom lipidov, glukózy, homocysteínu a železa. K markerom vrodeného rizika pre KVO patria variácie v génoch pre faktory zrážania krvi V (FV), II (protrombín), XIII (FXIII), β -fibrinogén (FGB), doštičkový glykoproteín IIIa (GPIIIa), inhibítor-1 aktivátoru plazminogénu (PAI-1), 5,10 metyléntetrahydrofolát reduktáza (MTHFR), angiotenzín konvertujúci enzým (ACE) ako aj apolipoproteíny B (Apo B) a E (Apo E). Apolipoproteín E (apo E) zohráva kľúčovú úlohu v metabolizme tukov. Jeho úlohou je sprostredkovať interakciu lipoproteínov s príslušnými receptormi. Apolipoproteínový gén je lokalizovaný na chromozóme 19q13.2 a vďaka dvom polymorfným miestam (C verzus T v kodónoch 112 a 158) vytvára tri hlavné izoformy (E2, E3, E4). V súčasnosti je dokázané, že rôzne apo E varianty zohrávajú dôležitú úlohu pri vzniku kardiovaskulárnych ochorení a Alzheimerovej choroby (AD).

V porovnaní s najčastejšou izoformou apo E3 (< 77%), je izoforma apo E4 s frekvenciou výskytu asi 8% spojená s poklesom a izoforma apo E2 (> 15%) so zvýšením celkového obsahu cholesterolu a obsahu LDL v sére. Predpokladá sa, že až 10% fenotypických variácií v obsahu cholesterolu v sére je podmienených génom apo E. Apo E4 izoforma sa považuje za

rizikový faktor pre vznik aterosklerózy a ochorenia koronárnych a periférnych ciev. Apo E4 izoforma je rovnako považovaná za rizikový faktor pre vznik familiárnej formy AD s neskorým nástupom a pre sporadické formy AD. Naproti tomu sa považuje apo E2 izoforma za protektívnu v prípade AD, nakoľko sa vyskytuje u týchto pacientov vzácné.

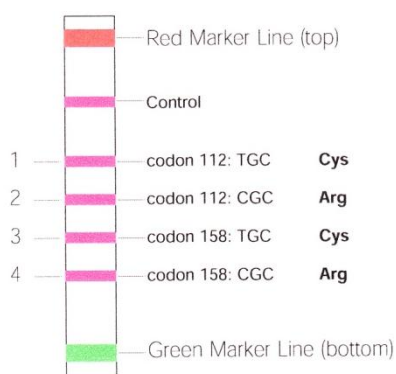
Rozdielne polymorfizmy sa dajú odlišiť po PCR buď priamo na základe odlišných veľkostí PCR produktov (typickým príkladom je inzerčno-delečný I/D polymorfizmus), alebo po štiepení vhodným restriktčným enzýmom a hybridizačnou analýzou.

Genetické testovanie nemusí v súčasnosti už slúžiť iba na určenie diagnózy. Moderné metódy umožňujú práve individuálne upraviť liečbu pacienta tak, aby bola efektívna, prípadne zabrániť jej nežiaducim účinkom. Jedným z príkladov môže byť liečba **tromboembolizmu**. Antagonisti vitamínu K (kumaríny) sú často používanými orálnymi antikoagulantami pri prevencii a liečbe žilového tromboembolizmu, infarktu myokardu a cievnych príhod. Kumarínové deriváty ako warfarin (Coumadin[®]), fenprocumon (Marcumar[®]), alebo acenokumarol (Sintrom[®]), vykazujú terapeutický účinok prostredníctvom inhibície epoxidreduktázy vitamínu K. Polymorfizmy v géne pre podjednotku 1 tohto enzýmového komplexu (VKORC1) ovplyvňujú citlivosť na kumarín. Rozdielna intenzita metabolizmu kumarínu býva spôsobená aj polymorfizmami v génoch pre CYP2C9 izoenzým cytochrómu P450, ktorý je dôležitý pre metabolizmus liečiv.

Výhody farmakogenetického prístupu k antikoagulačnej liečbe sú hlavne v presnosti určenia a udržania dávkovania kumarínu, v znížení rizika nesprávneho dávkovania počas indukčnej terapie, a v skrátení času pre dosiahnutie stabilizačnej terapie. Farmakogenetický test pre predpoveď požiadaviek na dávky kumarínu pomôže lekárom v klinickej praxi postupovať bezpečnejšie a individuálnejšie v liečbe svojich pacientov.

Iným príkladom genetického testovania môže byť aplikácia chemoterapie. Pyrimidínový analóg 5-fluorouracil (5-FU) je často používaným chemoterapeutikom pri

liečbe pevných nádorov ako sú kolorektálny karcinóm, nádory prsníkov, vaječníkov, nádory kože a ústnej dutiny s nosohltanom. Viac ako 80% podaného 5-FU sa detoxikuje v pečeni viacstupňovou metabolickou dráhou, v ktorej je limitujúcim enzýmom dihydropyridín dehydrogenáza (DPD). Jedinci s nízkou aktivitou DPD (asi 3-5% pacientov) nie sú schopní efektívne inaktivovať 5-FU a budú trpieť ťažkými až letálnymi hematologickými, gastrointestinálnymi a neurologickými intoxikáciami. Zistilo sa že vo väčšine prípadov je za to zodpovedná mutácia z G na A v zostrihovej rozpoznávacej oblasti 14. intrónu génu kódujúceho tento enzým. Mutovaná alela sa označuje ako DPYD*2A, produkuje nefunkčný enzým, lebo má vynechaný 14. intrón. Preto sa odporúča pacientov rutinne vyšetriť pred začiatkom chemoterapie s 5-FU na mutáciu IVS14+1 G>A. Heterozygótni pacienti by mali dostávať nižšie dávky, zatiaľ čo homozygóti majú vysoké riziko ťažkých komplikácií a je potrebné použiť alternatívne liekové preparáty.



Obrázok 8. Ukážky výsledku hybridizačnej analýzy DNA polymorfizmov v géne pre Apolipoproteín E.

Uplatnenie PCR vo forenznej medicíne.

Vo **forenznej medicíne** sa využíva genetická analýza na identifikáciu osôb v prípadoch závažných trestných činov a v prípadoch určenia sporného otcovstva. Najčastejšie sú na to využívané úseky VNTR, ktoré poskytujú štatisticky dostatočne presný výsledok. Ich

nevýhodou je však, že sa nedajú amplifikovať, ak je DNA v značne degradovanom stave. V takých prípadoch sa amplifikujú STR („short tandem repeats“), ktoré prežívajú v biologických vzorkách dostatočne dlho. Miera identity vzorky a príslušného jedinca sa počíta ako **pravdepodobnosť genetickej zhodnosti** príslušného znaku v populácii. Je samozrejme závislá od frekvencie výskytu príslušného znaku v populácii. Osobitnou oblasťou medicínskeho využitia PCR metódik spojených so sekvenovaním je zisťovanie genetickej kompatibility tkanív, na čo sa bežne využíva **hypervariabilná oblasť** systému leukocytových antigénov človeka (HLA systém). Tento super lokus obsahuje množstvo génov imunitného systému človeka, pričom sa celá táto skupina génov nachádza na chromozóme 6. HLA gény sú ľudskou verziou MHC („Major Histocompatibility Complex“), ktorý majú všetky stavovce.

HLA antigény zodpovedajúce MHC triede I (A,B,C) prezentujú malé peptidy vo vnútri buniek, ktoré vznikajú štiepením buď vlastných, alebo cudzorodých proteínov (vírusy, baktérie). Napádané sú CD8 pozitívnymi - cytotoxickými T-bunkami.

HLA antigény zodpovedajúce MHC triede II (DP, DM, DOA, DOB, DQ, DR) prezentujú antigény z vonkajšej strany T-lymfocytov. Tieto antigény stimulujú T-pomocné („T-helper“) bunky, ktoré potom stimulujú B-bunky produkujúce protilátky proti špecifickému antigénu.

HLA antigény korešpondujúce s MHC triedou III kódujú komponenty systému komplementu. Všetky HLA proteíny majú množstvo dôležitých úloh predovšetkým v obrane proti ochoreniam. Podieľajú sa na odolnosti voči onkologickým ochoreniam, podieľajú sa na vzniku autoimunitných ochorení (diabetes typu I, celiakia). Podľa najnovších teórií sú zodpovedné aj za individuálnu vôňu človeka zohrávajú tak úlohu pri výbere partnera.

V HLA komplexe je ešte mnoho iných génov zapojených do imunitnej odpovede. Diverzita HLA génov v ľudskej populácii je vysoká a šanca, že dvaja jedinci budú mať identické HLA

molekuly na všetkých lokusoch je veľmi malá. Preto je potrebné pri orgánových transplantáciách zabezpečiť čo najvyššiu podobnosť HLA systému.

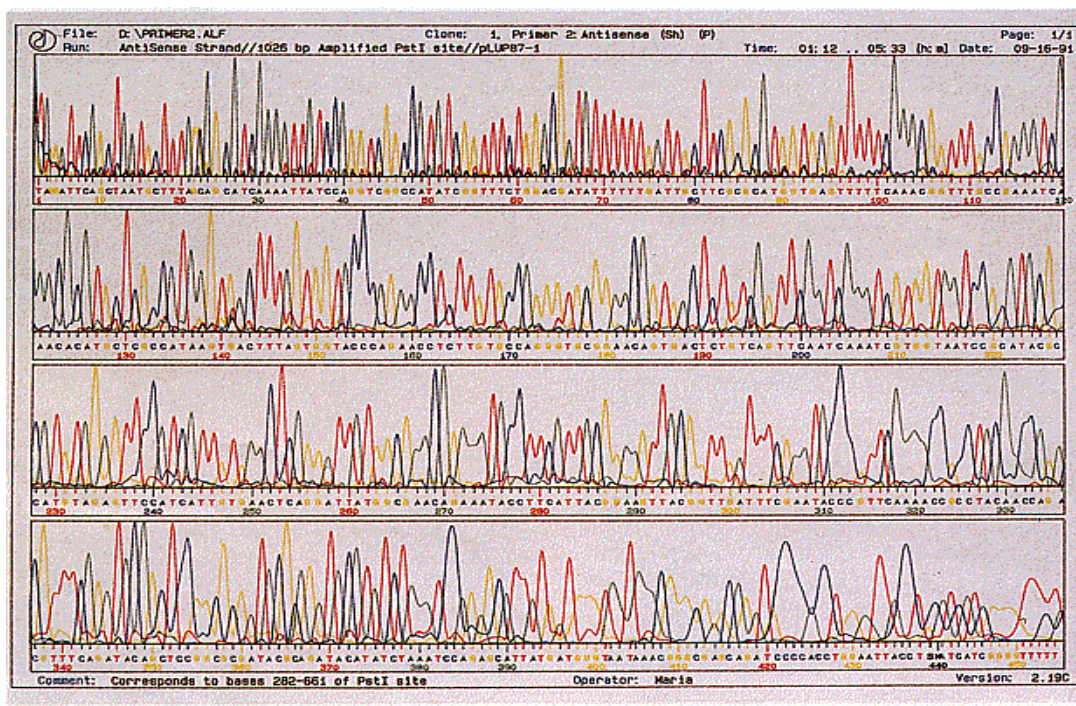
Princípy sekvenovania

Primárnym cieľom genetickej analýzy génu je stanovenie sekvencie nukleotidových báz. Na tento účel boli vyvinuté dve techniky

- a. metóda chemického štiepenia (Maxam-Gilbertova metóda) a
- b. enzymatická metóda (Sangerova metóda).

Metóda chemického štiepenia využíva bázovo-špecifické štiepenie DNA štyrmi rozličnými chemikáliami, jedna chemikália na každú bázu. Každá reakcia vytvára množstvo štiepných produktov o rozdielnych veľkostiach. Táto metóda sa dnes už pre svoju prácnosť a pomalosť využíva len zriedka.

V súčasnosti už prevládla metóda, kedy sa *podľa templátového vlákna syntetizujú polymerázovou reťazovou reakciou úseky DNA, ktorých narastanie sa zastaví vždy po zabudovaní chemicky zmeného analógu bázy- dideoxy nukleotidu*. Zároveň sú ostatné nukleotidy značené odlišnými flourescenčnými značkami. To umožnilo automatizáciu celého procesu (Obrázok 9). Vzniknutá zmes rôzne dlhých flourescenčne značených fragmentov DNA sa potom delí elektroforeticky v kapiláre z opticky neinterferujúceho materiálu. Laserovým emitorom sa excitujú flourescenčné spektrá jednotlivých báz, ktoré sa zaznamenajú detektormi a vyhodnotia softvérom.



Obrázok 9. Záznam sekvenovania fragmentu DNA Sangerovou metódou, čítanie sekvencie laserovým emitorom.

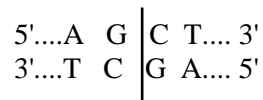
Mapovanie DNA restrikčnými enzýmami

Samotná molekula DNA je príliš dlhá na to, aby ju bolo možné priamo analyzovať. Našťastie, DNA je možné rozštiepiť na kratšie úseky, a to reprodukovateľným spôsobom. Na tento účel sa používajú enzýmy izolované z rôznych druhov baktérií, ktoré sa nazývajú **restrikčné endonukleázy**. Restrikčné endonukleázy rozpoznávajú špecifickú sekvenciu na DNA, ktorú štiepia. Táto špecifická sekvencia, ktorá má spravidla 4-8 nukleotidov sa nazýva **restrikčné miesto**. Veľkosť štiepných produktov potom závisí od vzdialenosti restrikčných miest a na kombinácii restrikčných endonukleáz.

Keďže DNA je vlastne dvojzávitnica s komplementárnou sekvenciou jednotlivých vlákien, niektoré restrikčné endonukleázy štiepia dvojvláknovú DNA asymetricky, pričom vytvárajú tzv. **kohézne** (jednovláknové) konce. Niektoré restrikčné enzýmy zas vytvárajú tzv. **tupé** konce, pretože štiepia dvojvláknovú DNA v jednom mieste.



Restrikčná endonukleáza Eco RI štiepi dvovláknú DNA tak, že vznikajú kohézne (lepivé) konce.



Restrikčná endonukleáza Alu I štiepi dvovláknú DNA tak, že vznikajú tupé konce.

METÓDY ŠTÚDIA PROTEÍNOV

Na rozdiel od nukleových kyselín sa proteíny vyznačujú omnoho väčšou rôznorodosťou v štruktúre, vlastnostiach a funkciách. V súčasnosti, keď sa už nazhromaždilo veľa údajov o štruktúre a funkcii génov, nadobúda zásadný význam štúdium funkcie a vzájomnej interakcie proteínov, ktoré v konečnom dôsledku priamo určujú jednotlivé metabolické deje. Vedný odbor, ktorý skúma štruktúru, funkcie a interakcie proteínov aj s ohľadom na gény ktoré ich kódujú, sa nazýva **Proteomika**. Pri sledovaní produktov génovej expresie je potrebné mať na zreteli základné vlastnosti študovaného proteínu, ako sú jeho rozpustnosť (solubilita), molekulová hmotnosť, podjednotkové zloženie a pod. Dôležitým faktorom je zdroj izolácie proteínov. Metódy izolácie budú rozdielne v prípade tkaniva a bunkovej kultúry, rovnako budú ovplyvnené obsahom nešpecifických proteáz a stabilitou izolovaných proteínov. Pre účely štúdia expresie sa najčastejšie používa identifikácia proteínu pomocou **väzby s protilátkou** (monoklonálnou, polyklonálnou), čo obvykle nevyžaduje zložité purifikačné postupy.

Izolácia proteínov

Proteíny v bunke môžeme zásadne rozdeliť na **cytosolické a membránovo-viazané**. Aj keď sa izolácia oboch uvedených typov proteínov líši, prvým krokom je vždy dezintegrácia a homogenizácia tkaniva, resp. buniek.

Homogenizácia

Tkanivo sa homogenizuje nožovým homogenizátorom, mäkké tkanivá a materiály z bunkových kultúr sa často homogenizujú šetrnejšie v homogenizátoroch Potter-Elvehjema (sklenená tuba, v ktorej rotuje zábrusový sklenený, alebo teflónový piest). Pre rozbitie buniek sa používa aj metóda ultrazvukových pulzov- **sonikácia**.

Roztoky, ktoré je možno použiť ako prostredie pre homogenizáciu a izoláciu proteínov sú rôzne, musia však spĺňať niektoré základné kritériá:

- stabilná osmolarita (najčastejšie sa používa 0,25 mol/L sacharóza)
- stabilné pH (najčastejšie stabilizované pomocou tlmivých roztokov Tris-HCl, alebo HEPES)
- viazané ióny kovových prvkov chelatujúcimi látkami ($MgCl_2$ a EDTA)
- redukcia disulfidových väzieb (glutatión, merkaptoetanol, ditiotreitol)
- udržanie molekúl proteínov v solubilnom stave (SDS a neiónové detergenty)
- inaktivácia nešpecifických proteáz (široká paleta komerčne dostupných inhibítorov proteáz)

Centrifugácia (odstredovanie)

Centrifugácia je proces, ktorý zahŕňa využitie odstredivej sily na sedimentáciu zmesí pomocou centrifúgy. Odstredivá sila je charakterizovaná otáčkami použitého rotora (rpm,

„revolutions per minute“), alebo zrýchlením vyjadreným ako g. Hrubý bunkový homogenát je potom možné rozdeliť centrifugáciou:

- 600-1000 x g v sedimente zostanú nezhomogenizované zvyšky tkanív, jadrá buniek a celé bunky
- 10 000 x g sedimentujú mitochondrie a lyzozómy, supernatant tejto frakcie sa obvykle používa pri štúdiu expresie cytosólových proteínov pomocou špecifických protilátok
- 100 000 x g sedimentujú mikrozómy, v supernatante sú rozpustné enzýmy a malé molekuly.

Ako už bolo spomenuté, izolácia membránových viazaných proteínov sa v niektorých aspektoch líši od jednoduchšej izolácie cytosólových proteínov. Obvykle je potrebné izolovať tzv. hrubú membránovú frakciu, ktorá je v sedimente po centrifugácii homogenátu na 10 000 x g. Proteínové integrované v membránach je niekedy ťažšie dostať do solubilnej formy a preto sa používajú rôzne **detergenty**, ako CHAPS, Nonidet P40, Tween 20, SDS, atď.

Polyakrylamidová gélová elektroforéza (PAGE)

Pojmom **elektroforéza** sa označuje pohyb nabitých častíc v elektrickom poli, kedy pozitívne nabité častice (katióny) putujú ku katóde a negatívne nabité častice (anióny) sa posúvajú k anóde. Keďže proteíny sú ***nositeľmi elektrického náboja***, gélová elektroforéza patrí medzi najúčinnšie metódy analýzy proteínov. Molekuly proteínov sa delia v elektrickom poli podľa veľkosti náboja, molekulovej hmotnosti a tvaru. Ďalšie faktory, ktoré ovplyvňujú pohyb proteínov v elektrickom poli sú pH média, sila elektrického poľa, typ deliaceho média a teplota. Pohyblivosť nabitých častíc sa dá vyjadriť zjednodušeným vzorcom:

$$m = p(\text{cm})/t(\text{s}).U(\text{V})$$

p = vzdialenosť, ktorú prešla molekula v géli

t = za jednotku času

U = pri určitom napätí

Podľa typu elektroforézy je treba zvoliť vhodné podporné médium-nosič. Prvým nosičom bol filtračný papier. Elektroforéza na filtračnom papieri trvala veľmi dlho, pretože sa dalo použiť len nízke napätie. Neskôr sa začali používať iné nosiče (acetátcelulóza, agaróza), kde sa dalo použiť vyššie napätie a tým sa trvanie elektroforézy výrazne skrátilo. V súčasnosti sa ako nosič na separáciu proteínov používa polyakrylamid, pretože je možné kontrolovať veľkosť vytvorených pórov. Taktiež, polyakrylamidový gél môže byť **homogénny** (kedy je veľkosť pórov rovnaká v celom géli), alebo tzv. **gradientový** (kedy je veľkosť pórov na vertikálnej osi gélov rozdielna). Najbežnejším spôsobom delenia proteínov je delenie podľa veľkosti molekúl (samozrejme, záleží na koncentrácii gélu). Dodecylsulfát sodný (SDS) sa naviaže na peptidové väzby a alkalické bočné reťazce proteínov, v dôsledku čoho získajú všetky molekuly rovnaký záporný povrchový náboj, delenie teda prebehne podľa veľkosti.

Iným typom elektroforetického delenia je tzv. **izoelektrická fokusácia**, alebo *dvojrozmerná PAGE*. Je to veľmi účinná metóda pre analýzu komplexných zmesí proteínov z buniek, tkanív a telesných tekutín.

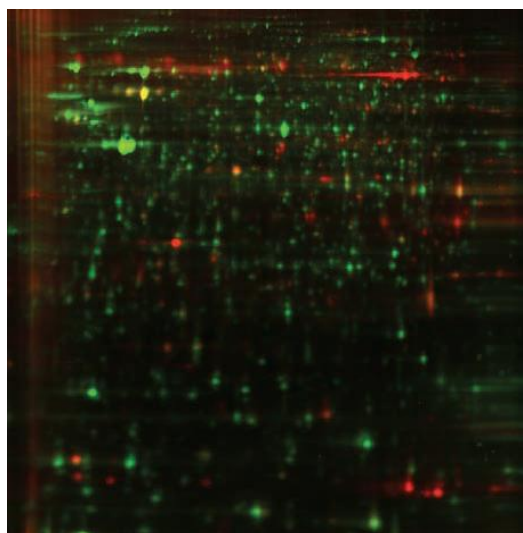
V prvom kroku pri izoelektrickej fokusácii (IEF) sa proteíny delia podľa izoelektrického bodu (pI). Druhým krokom je polyakrylamidová elektroforéza (PAG), pri ktorej sa proteíny delia podľa molekulovej hmotnosti (Mh, Mr, Mw). Každá škvrna, ktorá takýmto delením vznikne na géli, reprezentuje separátne proteín v určitej presnej kvantite. Zvýšenie presnosti tejto metódy prinieslo použitie imobilizovaných pH gradientov z amfotérnych roztokov (amfolíny).

Dvojrozmerná elektroforéza (Obrázok 10) sa v súčasnosti využíva na detekciu mnohých markerov pre ochorenia, pri monitorovaní účinnosti terapie, pri výskume liečiv a v onkologickom výskume.

Rozdelené proteíny je možné vizualizovať rôznymi farbiacimi technikami, ktoré môžu byť reverzibilné – Ponceau S, alebo ireverzibilné – Amido Black, Coomassie Blue, India Ink, koloidné zlato, soli striebra, fluorescenčné značenie. Ak chceme proteíny ďalej analyzovať metódou Western blotu a následnou väzbou protilátky, nie je vhodné použiť žiadne z týchto farbení gélov.

Príprava polyakrylamidového gélu (PAG)

Polyakrylamidový gél vzniká polymerizáciou voľných radikálov vytvorených z akrylamidového monoméru a sieťovacieho monoméru N,N-metylén-bis-akrylamidu. Veľkosť pórov PAG závisí nielen od koncentrácie oboch týchto monomérov, ale aj od ich vzájomného pomeru. Na začatie polymerizačnej reakcie je potrebné katalytický redox – systém poskytujúci voľné radikály – TEMED (N,N,N,N-tetrametyléndiamín) a persíran amónny. Polymerizácia potom prebieha medzi sklenenými platňami aparatury. Pre lepšie delenie vzoriek sa zvykne používať okrem PAG pre delenie, aj tzv. štartovací („stacking“) gél, ktorý sa líši hustotou a pH.



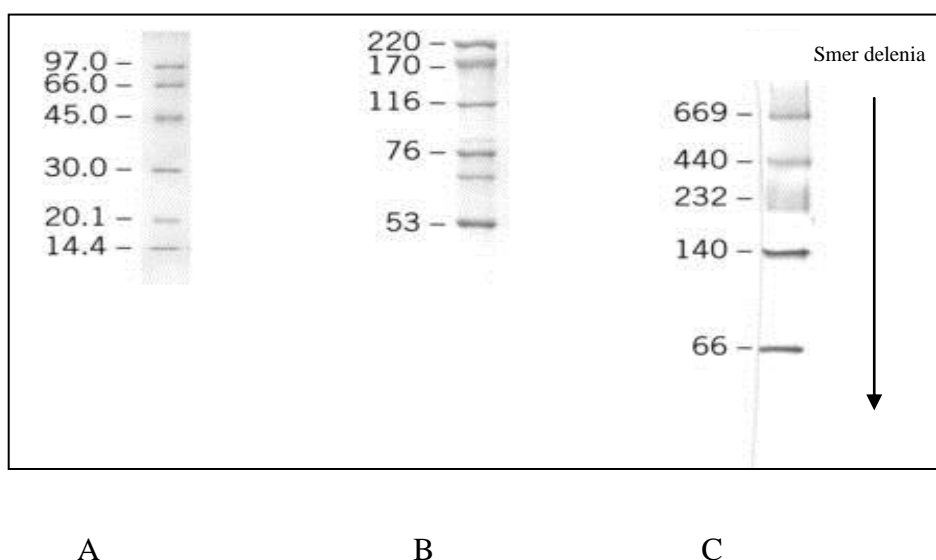
Obrázok 10. Dvojrozmerná elektroforéza zmesnej vzorky fluorescenčne značených proteínov z pečene potkana. Identifikácia proteínu je daná jeho polohou a kvantita je daná intenzitou signálu. Pre vysokú komplexnosť údajov (4-5000 bodov) sa dvojrozmerné gély vyhodnocujú pomocou skenujúcich denzitometrov a skeny pomocou príslušných softvérov.

Tabuľka č.3 Odporúčané koncentrácie akrylamidu v géli pre delenie proteínov

Veľkosť separovaných molekúl ($M_r \times 10^3$)	% akrylamidu v deliacom géli
36-205	5%
24-205	7,5 %
14-205	10%
14-66	12,5%
14-45	15%

Okrem homogénnych gélov sa často používajú aj tzv. **gradientové gély**, napr. 5-20%. Tieto gély majú lepšiu deliacu schopnosť a sú schopné rozdeliť širší rozsah proteínov podľa ich veľkosti. Obvykle používaná hrúbka gélov sa pohybuje v rozmedzí od 0,5 – 2,0 mm. Je potrebné mať na pamäti, že od hrúbky gélu závisí aj efektivita prenosu proteínov na membránu v procese Western blotu.

Upozornenie: nespolymerizované monoméry akrylamidu a bis-akrylamidu sú **NEUROTOXICKÉ**.



Obrázok 11. Delenie proteínov v SDS-polyakrylamidovom géli. Jednotlivé proteíny sa delia na základe molekulovej hmotnosti, ktorá sa dá vyjadriť číselnou hodnotou. Spravidla sa pre delenie nižších molekulových hmotností používajú gély s vyšším percentom polyakrylamidu

(A), pre proteíny s vyššou molekulovou hmotnosťou zasa s nižším percentom (B,C). Čím majú proteíny menšiu molekulovú hmotnosť, tým vzdialenejšie budú od štartu separácie.

Vizualizácia proteínových pruhov

Po ukončení elektroforetického delenia sa gél s rozdelenými proteínmi fixuje (spravidla metanolom) a následne farbí vhodnou farbičkou. Rozdelené proteíny je možné vizualizovať rôznymi farbiacimi technikami, ktoré môžu byť reverzibilné – Ponceau S, alebo ireverzibilné – Amido Black, Coomassie Blue, India Ink, koloidné zlato, soli striebra, fluorescenčné značenie. Ak chceme proteíny ďalej stanovovať metódou Western blotu a primárnou protilátkou, nie je vhodné použiť žiadne z týchto farbení gélov.

Príprava vzorky

Proteínovú zmes je treba pred elektroforetickou separáciou rozpustiť v roztoku s nižšou iónovou silou ako má tlmivý roztok, ktorý sa použije vo forme elektrolytu. Vyššia koncentrácia solí by mohla negatívne ovplyvniť ich separáciu, čo sa môže prejavovať vznikom nepravidelných a difúzných škvŕn. Ak sa k proteínom pridá SDS a redukujúce látky (2-merkaptóetanol, ditiotritol) a potom sa tepelne denaturujú rozruší sa ich trojrozmerná konformácia a molekuly zaujmú približne rovnaký paličkový tvar. Ukázalo sa, že SDS sa viaže na polypeptidy v konštantnom hmotnostnom pomere, vplyvom čoho im udeľujú skoro rovnaký záporný náboj. Týmto sa eliminujú pôvodné nábojové rozdiely medzi ich molekulami. **Elektroforetická pohyblivosť** takto upravených molekúl proteínov a polypeptidov je potom len funkciou ich relatívnych molekulových hmotností. V neposlednej rade je dôležité, aby vzorkový tlmivý roztok obsahoval aj látku podstatne ťažšiu ako voda – najčastejšie glycerín. Glycerín po premiešaní s proteínmi ich udrží v nanášacom kanáliku a zabráni ich vyplaveniu.

Do vzorkového tlmivého roztoku sa tiež pridáva Brómfenolová modrá, ktoré spoľahlivo ukazuje, ako ďaleko do gélu sa vzorka dostala, pretože má veľmi malú veľkosť a teda putuje ako prvá. Pri elektroforetickej separácii je veľmi dôležité zvážiť, aká nanáška proteínov bude potrebná (a optimálna) na gél. Ak detegujeme nejaký cytosolický proteín alebo bežný membránový proteín, stačí nám nanáška 5-20 µg/dráhu. V prípade nie tak bohato zastúpených proteínov, je optimálna nanáška 25-50 µg/dráhu. Nanáška nad 100 µg spravidla nemá zmysel, lebo prekračuje deliaci rozsah gélu a výsledkom veľmi často býva len fľak.

Prenos (blotovanie) proteínov na membránu -WESTERN BLOT

V procese prenosu proteínov rozdelených v PAG na membránu je dôležité zvolenie blotovacej metódy a správneho typu membrány. V súčasnosti sa používajú dve metódy blotovania- mokrý blot a polosuchý blot. Tzv. mokrý blot prebieha v aparátúre , kde je ponorený sendvič zložený z gélu s proteínmi a blotovacej membrány do vodivého roztoku. Aparatúra , má podobne ako elektroforetická, dve elektródy a vodivý roztok zabezpečuje vytvorenie homogénneho vodivého poľa. Tento spôsob je účinný, ale náročný na spotrebu blotovacích roztokov, ktoré musia byť z kvalitných reagensov. Mokrý typ je v súčasnosti vytlačovaný tzv. polosuchým („semidry“) blotom. Gél a membrána vytvoria rovnako ako v predchádzajúcom prípade sendvič, ale prenos prebieha medzi plošnými elektródami s pruhmi papierov nasiaknutými blotovacími roztokmi. Tento spôsob blotu nielen že šetrí množstvo roztokov, ale je aj rýchly a efektívny, nakoľko plošné elektródy vytvárajú homogénne elektrické pole. Pre rovnomerný prenos proteínov z gélu na membránu je potrebné zabezpečiť v oboch prípadoch úplný kontakt bez vzduchových bublín (tam, kde sú prítomné bubliny nedochádza k prenosu). Z membrán je možné použiť dva typy – polyvinylidéndifluoridové (PVDF) a nitrocelulózoové membrány. PVDF membrány sa musia pred prenosom aktivovať v 100% metanole a ekvilibrovať v blotovacom roztoku. Sú to odolné a pevné membrány, ich

nevýhodou je , že sa už nedajú ďalej chemicky modifikovať. Nitrocelulózové membrány sú ďaleko rozšírenejšie . Klasická nitrocelulóza je veľmi krehká a ťažko sa s ňou pracuje, preto sa dnes používa nitrocelulóza nanosená na nylonovú matricu. Použitie týchto membrán je veľmi pohodlné a jednoduché. Navyše, ich viacvrstvová konštrukcia umožnila vývoj smerom k špecializovaným aplikáciám a dnes sú komerčne dostupné nitrocelulózové membrány so zvýšenou afinitou pre detekciu biotinylovaných proteínov, alebo proteínov detegovaných chemiluminiscenciou (ECL). Napriek maximálnemu zjednodušeniu práce s nitrocelulózovými membránami je potrebné mať pri práci s nimi na pamäti tieto zásady:

- membrány je potrebné skladovať v suchu a v tme
- pracovať s nimi v rukaviciach a s pinzetou – inak pridáte k blotom aj odtlačky prstov
- aj napriek modernizácii a maximálnemu zvýšeniu bezpečnosti, nitrocelulóza je horľavá a výbušná látka , preto ich chráňte pred vysokými teplotami a ohňom.

Po ukončení blotovania je možné si skontrolovať prenos proteínov na membránu krátkym zafarbením s Ponceau Sa odfarbením v redestilovanej vode. Účinnosť Western blotu nikdy nie je 100% takže keby sme ofarbili aj gél po blote, našli by sme aj tu proteínové pásy.

Imunochemická detekcia sledovaných proteínov na nitrocelulózovej membráne

Výber vhodnej primárnej protilátky

Protilátky patria do skupiny globulínov nazývaných imunoglobulíny. Imunoglobulíny (Ig.) možno rozdeliť na 5 hlavných skupín IgG, IgA, IgM, IgD, IgE. Každý imunoglobín je zložený z dvoch identických ťažkých a dvoch identických ľahkých reťazcov. Ťažké reťazce určujú antigénne a štrukturálne vlastnosti imunoglobulínov. Podľa špecificity, ako aj podľa mechanizmu prípravy protilátok môžeme na detekciu exprimovaného proteínu ukotveného na membráne Western blotom použiť dva typy protilátok.

Polyklonálne protilátky- sú produkované rozdielnymi bunkami imunitného systému živočíchov a reagujú s viacerými epitopami antigénu, proti ktorému boli vyrobené. Výhodou ich použitia je reakcia s viacerými epitopami a nami sledovaný proteín môže byť aj ľahšie poškodený izolačnými a blotovacími procedúrami. Nevýhodou je práve ich nižšia špecificita a možnosť väzby aj s inými, podobnými proteínmi. Najčastejšie sa na produkciu polyklonálnych protilátok používajú zvieratá ako králik, koza, ovca, ošípaná (kvôli svojej veľkosti). Pri výbere zdroja primárne protilátky je treba brať do úvahy aj aký typ a značenie sekundárnej protilátky budeme mať k dispozícii. Komerčne najčastejšie dostupné sekundárne protilátky sa produkujú proti ľudským, králičím, kozím, ovčím a myším primárnym protilátkam.

Monoklonálne protilátky – sú produkované klonmi plazmatických buniek a reagujú len so špecifickým epitopom antigénu, voči ktorému boli vyrobené. Ich výhodou je teda vysoká špecificita, častokrát aj druhová špecificita a možnosť rozlíšiť pomocou nich rôzne podtypy, izoformy, prípadne podjednotky komplikovaných proteínových komplexov. Na produkciu monoklonálnych protilátok sa používajú myši.

Ďalšie imunologické metódy sú uvedené v kapitole Imunologické metódy.

Faktory ovplyvňujúce výsledky imunochemického farbenia

Faktory, ktoré ovplyvňujú farbenie protilátkami sú titer protilátok, riedenie protilátok, inkubačný čas a inkubačná teplota.

Titer protilátok

Titer protilátok je definovaný ako najvyššie riedenie protilátky, ktoré vyústi do optimálneho špecifického farbenia s čo najmenším pozadím. Titre protilátok varíujú od 1:10 do 1:100 pre monoklonálne protilátky v supernatante bunkovej kultúry, cez 1:100 do 1:2000 pre

polyklonálne protilátky a až 1:1000000 a viac pre monoklonálne protilátky v ascitickej tekutine.

Inkubačný čas

Existuje inverzný vzťah medzi inkubačným časom a titrom protilátky - čím vyšší je titer, tým kratší môže byť inkubačný čas. Inkubačný čas pre primárnu protilátku varíruje od 1.5 min do 48 hod., pričom optimálny čas je 30 min až 1 hod.

Teplota inkubácie

Pretože rovnovážny stav v reakcii antigén – protilátka sa dosiahne rýchlejšie pri 37°C než pri izbovej teplote, niektorí uprednostňujú inkubáciu pri vyšších teplotách. Naopak, zníženie teploty na 4°C umožní pre väčšinu protilátok inkubáciu cez noc, alebo aj dlhšie.

Sekundárne protilátky a detekčný systém

Sekundárne protilátky sú produkované vo forme protilátok proti IgG frakcii. Tieto protilátky (zvyčajne enzymaticky značené) sa viažu na primárnu protilátku a umožňujú jej detekciu. Kedysi bola najbežnejšou metódou detekcia radioaktívnymi izotopami. V súčasnosti sa veľmi často používa zosilnená chemiluminiscencia (ECL) a fluorescenčné techniky.

ECL (enhanced chemiluminescence) metóda

ECL je svetlo emitujúca neradioaktívna metóda, využívaná na detekciu imobilizovaných špecifických antigénov, konjugovaných priamo alebo nepriamo s protilátkami značenými chrenovou peroxidázou („horseradish peroxidase“, HRP). Luminiscencia je definovaná ako emisia svetla v dôsledku uvoľnenia energie zo substance v excitovanom stave. Pri chemiluminiscencií je excitácia zapríčinená chemickou reakciou. Chemické reakcie sú

založené na oxidácii cyklických diacylhydrazidov (luminolu) majú široké využitie v chemickej analýze. HRP/H₂O₂ katalyzovaná excitácia luminolu v alkalickom prostredí patrí k najpreštudovanejším systémom. Zvýšená chemiluminiscencia (ECL) sa dosahuje oxidáciou luminolu s HRP v prítomnosti chemických zosilňovačov, napr. fenolov. Táto reakcia zvýši uvoľnenie svetla asi 1000x a predĺži čas svetelnej emisie. Maximum svetla sa uvoľní v priebehu 5-20 min a následne začne signál klesať. Maximálna svetelná emisia je pri vlnovej dĺžke 428 nm túto oblasť emisie je možné vizualizovať na svetlocitlivých filmoch. Modifikáciou tejto metódy je ECL-Plex metóda, kedy nie sú sekundárne protilátky konjugované s chrenovou peroxidázou, ale s fluorescenčnými farbivami Cy3 (max 570nm) a Cy (max 670 nm). Výhodou je možnosť sledovania expresie dvoch rozdielnych proteínov súčasne, pričom signál je stabilný počas dlhšieho obdobia (3-5dní). Nevýhodou je potreba zobrazovacieho zariadenia pre oblasť fluorescenčnej emisie.

ECF (enhanced chemifluorescence) metóda

V prípade tejto metódy sú sekundárne protilátky značené fluoresceínom, ktorý je možné detegovať priamo (max 540-560 nm). Znamená to značné urýchlenie a zjednodušenie práce. Obmedzením tejto metódy je, že ak sledované proteíny sú exprimované v malých množstvách, je potrebné amplifikovať signál terciárnou protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou.

Biotín-avidínové metódy

Tieto metódy využívajú vysokú afinitu avidínu alebo streptavidínu pre biotín. Avidín obsahuje štyri väzbové miesta pre biotín. V skutočnosti sa na avidín viaže menej než 4 biotíny, kvôli sterickým prekážkam. Na detekciu primárnej protilátky sa používa biotinylovaná sekundárna protilátka. Niektoré tkanivá, ako napr. pečeň alebo obličky

obsahujú endogénny biotín, ktorý musí byť dopredu blokovaný, aby sa predišlo vysokému nešpecifickému farbeniu.

Chromatografia

Je súbor laboratórnych techník, pomocou ktorých je možné rozdeliť rôznorodé a komplexné zmesi na jednotlivé časti. Pre delenie zmesí proteínov sa používa metóda **FPLC** („Fast protein liquid chromatography“). Delenie sa uskutočňuje v chromatografických kolónach naplnených chromatografickými médiami, ktoré sa volia podľa typu metódy a charakteru delených proteínov. Súčasné techniky FPLC sa rozdeľujú na:

1. **Gélovú filtráciu** – zmesi proteínov sa delia na základe veľkosti
2. **Iónomeničovú chromatografiu** – proteíny sa delia podľa povrchového náboja , pričom ich náboj je slabší ako náboj chromatografického média
3. **Chromatografiu na reverznej fáze** – delenie podľa náboja, ale chromatografické médium má slabší náboj ako delené proteíny
4. **Afinitnú chromatografiu** – proteíny sa delia podľa schopnosti naviazať sa na určitý ligand ukotvený v chromatografickom médiu

Pri kolónových chromatografických metódach sa najčastejšie používajú nasledovné pojmy:

Mobilná fáza – zmes, ktorú nanášame na kolónu a delíme

Imobilizovaná fáza (stacionárna) – médium, ktorým je naplnená kolóna

Analyt – izolovaná molekula

Eluent, solvent – roztok, ktorý vytvára prostredie pre delenie v kolóne

Eluát – roztok opúšťajúci kolónu po aplikovaní eluentu

Chromatogram – grafický záznam priebehu chromatografie

Ve – elučný objem, ktorý sa vzťahuje na molekulový rozmer izolovanej molekuly

V_0 („Void volume“) – slepý objem kolóny, je elučný objem molekúl, ktoré sú väčšie než najväčšie póry v zvolenom médiu a nebudú sa deliť, iba pretečú kolónou

V_t – celkový objem kolóny

R_s – rozlišovacia schopnosť, vyjadruje stupeň oddelenia medzi dvomi frakciami proteínov

K_{av} a $\log M_r$ – koeficient častíc média a log molekulovej hmotnosti, definujú selektivitu filtračného média pre určitý rozmer molekúl

Chromatografiu je možné používať v analytickej forme, kedy ide zvyčajne o analýzu a identifikáciu určitého proteínu, alebo v preparatívnej forme, ktorá sa využíva skôr v priemyselných aplikáciách a ide o purifikáciu čo najväčšieho množstva proteínu.

Gélová filtrácia je založená na delení molekúl podľa veľkosti (Obrázok 12). Zmes proteínov preteká cez gélové filtračné médium s presne definovanými veľkosťami častíc, naplnené v stĺpci v kolóne. Táto metóda je vhodná pre biomolekuly citlivé na zmeny pH, koncentráciu kofaktorov a podmienky prostredia pri izolácii. Separácie sa dajú uskutočniť v prítomnosti kofaktorov, iónov kovov, v prítomnosti denaturačných látok ako sú močovina, guanídium chlorid, pri 37°C, alebo pri 4°C. Najčastejšie používané médiá pre gélovú filtráciu sú:

- **Sephadex** (Separation **P**harmacia **D**extran)- patentovaný v roku 1959 švédskou spoločnosťou Pharmacia pri univerzite v Uppsale. Dextran vytvára trojrozmernú sieť, vyrába sa s časticami s rozmerom 20 – 300 μl a v rôznych modifikáciách. Pre dobrú schopnosť viazať anorganické soli sa používa aj na ich odstránenie zo vzoriek proteínov.
- **Sepharose** – agaróza izolovaná z morských rias zosieťovaná s aminokyselinou lyzínom.

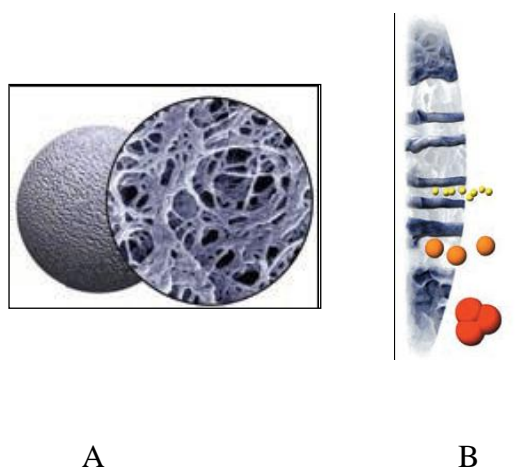
Iónomeničová chromatografia (Obrázok 13) je založená na interakcii povrchového náboja proteínov s nábojom chromatografického nosiča. Podľa povahy náboja sa delia nosiče na

katiónové (katexy) – nesúce kladný náboj a na *aniónové (anexy)* – nesúce záporný náboj.

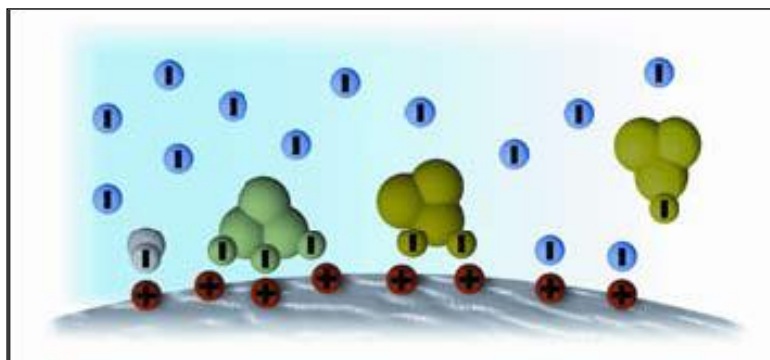
Podľa povahy interakcie sa delia na silné a slabé iónomeniče.

Silné iónomeniče – sú kompletne ionizované v širokom spektre hodnôt pH

Slabé iónomeniče – sú závislé na pH. Slabý anex so stúpajúcim pH stráca náboj, naopak slabý katex pri stúpajúcom pH náboj získava. Najčastejšie sa používajú deriváty Sephadexu a Sepharosy (DEAE Sephadex, ANX Sepharose).



Obrázok 12. A- častica Sephadexu s menšími pórmí a sieťovaná agaróza – Sepharose. B- jednotlivé zložky zmesi proteínov sa pohybujú vo zvislom stĺpci chromatografickej kolóny podľa veľkosti. V kolóne sa rýchlejšie pohybujú väčšie proteíny, menšie budú zadržované dlhšiu dobu.



Obrázok 13. Princíp iónomeničovej chromatografie. Proteíny sa viažu na nosič povrchovým nábojom. Zmenou iónovej sily elučného roztoku dochádza k zmene náboja nosiča a k uvoľneniu proteínov podľa veľkosti náboja.

Modifikáciou iónomeničovej chromatografie je *chromatografia na reverznej fáze*, kedy je v chromatografickej kolóne nepolárna stacionárna fáza. Polárne zložky sa vymyjú a nepolárne zložky sa zachytia.

Afinitná chromatografia (Obrázok 14) je veľmi rozšírenou metódou pre izoláciu a purifikáciu biomolekúl. Využíva sa pritom schopnosť nekovalentnej väzby niektorých proteínov na niektoré látky. Táto schopnosť je buď prirodzenou vlastnosťou, alebo sú to proteíny geneticky modifikované tak, aby boli špecificky označené počas expresie („tagged“). Variantom afinitnej chromatografie je **IMAC** („Immobilized metal ion adsorption“), pri ktorej sa využíva to, že sa proteíny viažu na chromatografickú náplň derivovanú kovovými iónmi (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) podľa toho, koľko majú histidínových, tryptofánových alebo cysteínových zvyškov. Medzi často používané väzbové deriváty patria:

Lektíny – proteíny sa na ne viažu cukornými skupinami, izolujú sa tak polysacharidy a glykoproteíny. Táto väzba je zodpovedná za aglutináciu červených krviniek, alebo nádorových buniek a predstavuje analógiu k väzbe antigénu s protilátkou.

Heparín – viaže koagulačné faktory, lipoproteín lipázy, DNA viažuce proteíny a faktory proteosyntézy.

Proteín A – sa vysoko špecificky viaže na IgG.

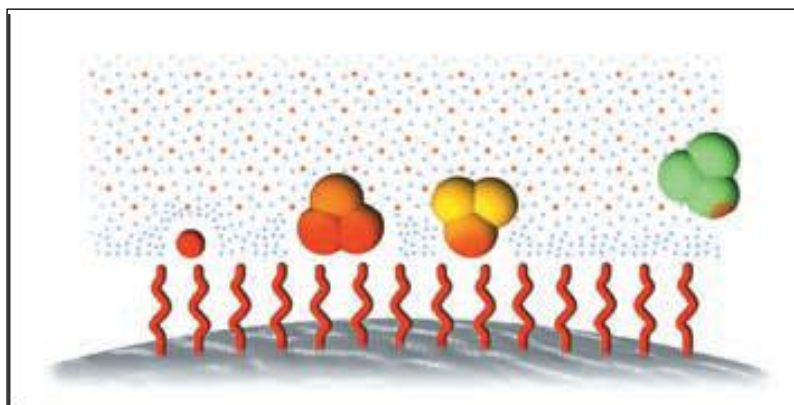
Benzamidín – viaže serínové proteázy.

Kalmodulín – okrem všetkých proteínov, ktoré viažu kalmodulín, zachytáva aj niektoré neuromediátory, proteín kinázy a fosfodiesterázy.

Streptavidín – viaže všetky biotinylované proteíny.

Záver

Okrem už spomínaných metód na štúdium zmien génovej expresie a proteínu , existuje množstvo iných metód. Preto je potrebné výber vhodnej metódy podriadiť cieľu , ktorý pomocou danej metódy chceme zodpovedať , pričom treba zobrať do úvahy nielen možnosti, ale aj limitácie metódy.



Obrázok 14. Afinitná chromatografia využíva princíp väzby proteínu na niektoré látky s vysokou afinitou. Látky s nižšou, alebo žiadnou afinitou sa na nosiči nezachytia.

IMUNOLOGICKÉ METÓDY

Imunológia je širokou vednou disciplínou, ktorá sa zaoberá funkciami a štruktúrou imunitného systému. Medzi hlavné vlastnosti imunitného systému patrí:

- Schopnosť rozpoznať vlastné štruktúry od cudzích, alebo vlastných modifikovaných štruktúr
- Schopnosť špecificky reagovať na istú štruktúru
- schopnosť reagovať nešpecificky na rozmanité spektrum cudzorodých štruktúr
- pamäť, ktorá umožňuje pohotovú reakciu pri opakovanom strete s cudzorodým agensom

Látka, resp. molekula alebo fragment molekuly, ktorá má schopnosť navodiť špecifickú imunitnú odpoveď sa nazýva **antigén**. Chemicky sú antigény zvyčajne proteíny alebo polysacharidy. Miesto, ktoré je na molekule antigénu špecificky rozpoznávané nazývame determinant, alebo **epitop**. Ide o fragment, ktorý je viazaný na molekulu hlavného histokompatibilného komplexu (MHC) a prezentovaný T lymfocyту, alebo je schopný špecifickej väzby na väzbovom mieste protilátky.

Rozlišujeme telu vlastné antigény („self antigens“), tolerované imunitným systémom a cudzorodé „non-self“ antigény, ktoré sú atakované imunitným systémom.

Vlastnosti antigénu schopného vyvolať imunitnú odpoveď sú cudzorodosť, biochemická štruktúra, molekulová hmotnosť, dávka a cesta preniknutia do organizmu, biologické faktory (vek, hormóny, genetická determinácia). Imunitný systém človeka tvoria primárne (centrálne) lymfatické orgány - kostná dreň a týmus, v ktorých sa vyvíjajú nezrelé lymfocyty, a sekundárne (periférne) lymfatické tkanivá, ktoré sú zdrojom antigénu prezentovaného zrelým lymfocytom. Tieto tkanivá sú - lymfatické uzliny, koža, appendix, nazofaryngeálne a faryngeálne uzliny, slezina, Peyerove ostrovčeky v gastrointestinálnom trakte a lymfoidné tkanivá lokalizované v rôznych orgánoch (broncho-tracheálny, nazálny a vulvo-vaginálny trakt). Tkanivo kostnej drene produkuje v procese tvorby krvných buniek (hematopoéza) **kmeňové bunky** (HSCs), z ktorých sa vyvíjajú ďalšie špecializované bunky imunitného systému. Tieto bunky zaručujú špecifickú imunitnú odpoveď. V prvom rade sú to leukocyty. Aby leukocyty mohli fungovať efektívne je dôležité aby boli na v mieste infekcie alebo prítomnosti parazitov čo najrýchlejšie, túto efektivitu leukocytov odhliadnuc od typu imunitného systému zabezpečujú tzv. **chemotaktické faktory** ako sú napr. histamín alebo proteíny komplementu. Chemotaktické faktory slúžia ako markery infekcie a priťahujú leukocyty. Sú vylučované buď leukocytmi alebo tkanivami. Bunky nešpecifického imunitného systému vzájomne kooperujú s bunkami špecifického imunitného systému.

V modernej imunológii sa z funkčného hľadiska delí imunitná odpoveď na vrodenú a získanú (adaptačnú). Adaptačná odpoveď môže byť celulárneho alebo humorálneho charakteru. Humorálna odpoveď je definovaná ako interakcia *protilátky* a *antigénu*. Protilátky sú špecifické proteíny uvoľňované z B lymfocytov, zatiaľ čo antigénom môže byť všetko čo vyvolá ich produkciu. Rovnako dôležitá je aj bunková odpoveď, pri ktorej dochádza nielen k ničeniu infikovaných buniek a buniek patogénov, ale je aj nevyhnutnou súčasťou protilátkovej odpovede organizmu.

Protilátky – po chemickej stránke sú to γ -globulíny a čiastočne aj β - a α 2-globulíny – spoločne sa označujú ako imunoglobulíny. Základnú štruktúru tvorí monomér zložený z dvoch reťazcov, ťažkého H a ľahkého L spojených disulfidovým väzbami. Na základe existencie rôznych ťažkých reťazcov – γ , μ , α , δ a ξ sa imunoglobulíny rozdeľujú na IgG, IgM, IgA, IgD a IgE. Reťazce H aj L sa členia na relatívne samostatné úseky tzv. domény, ktoré môžu byť variabilné (VL, VH) alebo konštantné (CL, CH).

Variabilné domény sa pri jednotlivých protilátkach odlišujú – v ich štruktúre sú tzv. hypervariabilné úseky, ktoré sa bezprostredne podieľajú na väzbe antigénu.

Pri štiepení Ig-monoméru proteolytickými enzýmami vznikajú charakteristické fragmenty Fab a Fc → Fab-fragment má schopnosť viazať antigén a Fc-fragment kryštalizuje. Konštantná oblasť zodpovedá za biologické funkcie protilátok – prechod placentou, väzbu komplementu, väzbu na Fc receptory.

Polyklonálne protilátky sú produkované rôznymi B bunkami. Predstavujú kombináciu imunoglobulínových molekúl produkovaných voči špecifickému antigénu, ale identifikujúcich rozdielne epitopy antigénu. **Monoklonálne** protilátky predstavujú populáciu klonov jednej parentálnej imunitnej bunky – sú monošpecifické voči jednému epitopu antigénu.

Väzba antigénu s protilátkou

Stanovenie väzby antigénu s protilátkou je základným princípom takmer všetkých vyšetrovacích metód v imunológii. Protilátky sú sekretované vo forme imunoglobulínov. Každý imunoglobulín sa skladá z dvoch ťažkých a dvoch ľahkých reťazcov (λ a κ) spojených navzájom disulfidickými väzbami. Ťažké reťazce predstavujú konštantnú oblasť imunoglobulínu, zatiaľ čo ľahké reťazce obsahujú variabilné oblasti ktoré sa priamo viažu s antigénom.

Prehľad ľudských imunoglobulínov aj s ich veľkosťami je uvedený v Tabuľke.

	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgE
Ťažký reťazec	μ	δ	γ_1	γ_2	γ_3	γ_4	α_1	α_2	ϵ
Molekulová hmotnosť v kDa	970	184	146	146	165	146	160	160	188
Hladina v sére dospelého človeka mg.ml⁻¹	1,5	0,03	9	3	1	0,5	2,0	0,5	5×10^{-5}

Väčšina antigénov má viacnásobné – multivalentné epitopy, v prevažnej väčšine sú tvorené polysacharidmi a peptidmi. Väzba medzi protilátkou a antigénom je nekovalentná, zúčastňujú sa na nej elektrostatické sily vodíkových mostíkov a Van der Waalsove sily. Sila interakcie medzi epitopom a jedným väzbovým miestom protilátky sa nazýva ***afinita***, súbor všetkých vzájomných interakcií sa označuje ako ***avidita***. ***Špecificita*** protilátky spočíva v jej schopnosti reagovať iba s určitým antigénom, ***skrížená reaktivita*** („cross reactivity“) znamerná reakciu protilátky s dvomi a viacerými antigénmi, najčastejšie preto, lebo majú rovnaké, alebo veľmi podobné epitopy.

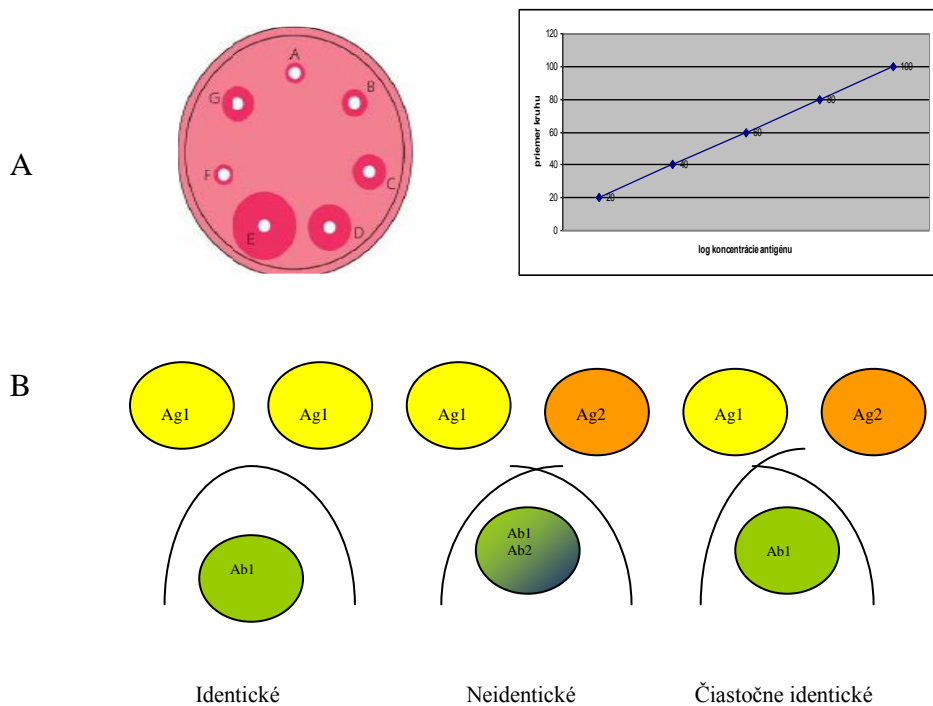
Metódy, ktoré využívajú neznačený antigén/protilátku

Precipitácia

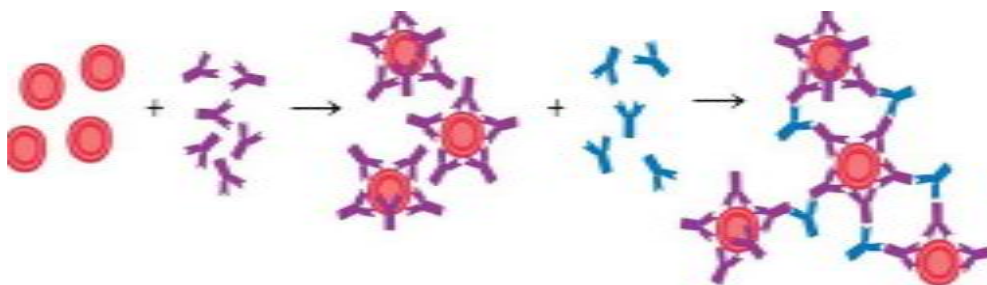
Táto metóda je založená na vzniku viditeľného precipitátu antigénu a protilátky v roztoku, alebo v agarózovom géle (Obrázok 15). Existuje viacero typov precipitačných testov (Ouchterlonyho dvojité difúzia, raketová imuno elektroforéza a pod.), ich aplikácia je však veľmi obmedzená. Obvykle sa zmieša vyšetřovaná vzorka krvi s určitým druhom antigénu, aby sa zistila prítomnosť protilátky. Precipitát sa obvykle meria metódami rozptylu svetla (nefelometria, turbidimetria). Tento postup sa najčastejšie používa pri podozrení na plesňové infekcie a pri niektorých meningitídach. Nakoľko však pozitívny výsledok vyžaduje veľké množstvo protilátok aj antigénu, ide o metódy s najnižšou citlivosťou – 30 µg/ml.

Aglutinácia

V aglutinačných testoch (latexová aglutinácia, koagregácia) sa častica (latex alebo baktéria) naviaže do komplexu s antigénom alebo protilátkou. Vzniknutý komplex sa zmieša so vzorkou (sérum, cerebrospinálna tekutina). Ak je prítomná protilátka, alebo antigén, reagujú s komplexom a vytvoria merateľný precipitát. Aglutinačné testy sú rýchle, a citlivejšie ako precipitácia (1 µg/ml). Pokiaľ sa pre aglutinačné testy používa plná krv, erytrocyty majú silne negatívny elektrický potenciál, ktorý môže brániť aglutinácii, čo je napríklad problémom pri zisťovaní Rh faktora. Rieši to tzv. Coombsov test (Obrázok 16), v ktorom sa aplikuje anti-imunoglobulínové sérum (Coombsovo činidlo). Aglutinačné testy sa používajú v praxi aj na stanovenie prítomnosti drog (kokaín, heroín), alebo sa využívajú hemaglutinačné vlastnosti niektorých vírusov (chřípka, rubeola), kedy práve prítomnosť protilátok v sére pacienta inhibuje aglutináciu.



Obrázok. 15. Príklad precipitačných metód. A – radiálna difúzia pri ktorej je protilátka rozpustená v géli, antigén je pridaný do jamiek. Výsledok je meraním priemeru vzniknutých kruhových zón vzniknutých po aplikácii vzorky do známeho množstva protilátky. B – dvojité protismerná difúzia, protilátka a antigén difundujú proti sebe v agarózovom géle.



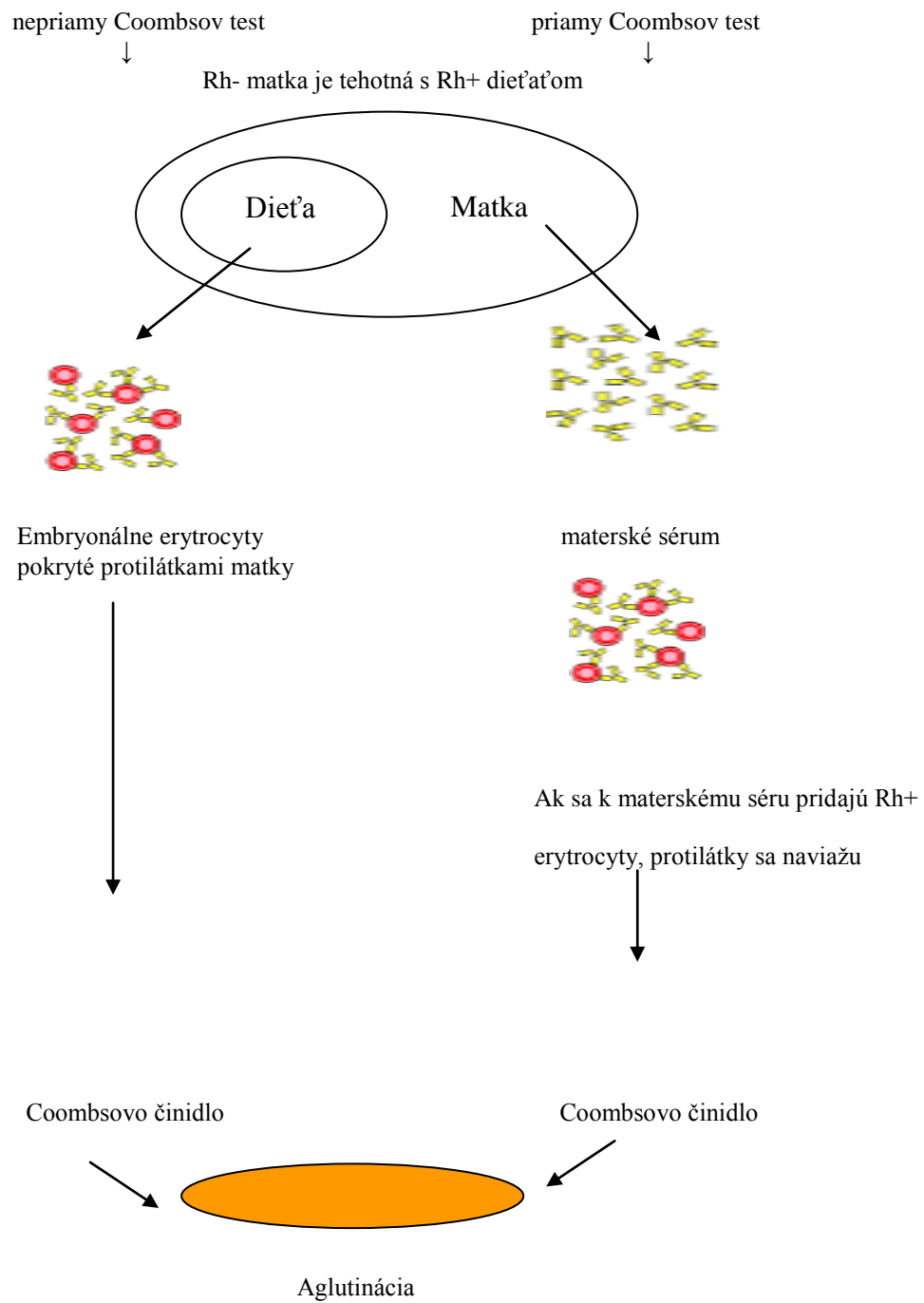
antigén + protilátka (Ig) → žiadna aglutinácia + anti Ig → aglutinácia

Obrázok 16. Princíp priameho Coombsovoho testu. Aglutinácia sa objaví ak boli erytrocyty pokryté protilátkou.

Komplement je tvorený zmesou molekúl s rôznym významom a funkciou. Starší názov „alexín“ bol nahradený názvom komplement, pretože kompletizuje funkciu protilátok. Jednotlivé proteíny komplementu sa označujú písmenom C a poradovým číslom, podjednotková štruktúra malými písmenami. Napr. Podjednotky C1 sú jedna C1q, a po dve podjednotky C1r a C1s. Všetky zložky komplementu (okrem faktora D) sú syntetizované v neaktívnej forme a aktivácia nastane až po proteolýze. Proteolytickým štiepením zložiek komplementu vznikajú menšie fragmenty (a), väčšie fragmenty (b), alebo ich degradačné produkty (c, d, e atď). Niektoré proteíny komplementu môžu mať enzýmovú aktivitu, alebo aj iné funkcie a označujú sa podľa nich. Aktivácia môže prebehnúť klasickou väzbou s imunoglobulínmi, väzbou s povrchovými **lektínmi**, alebo s cudzorodými agens ako sú mykózy, mikroorganizmy a vírusy. Jednotlivé fragmenty komplementu sa viažu na príslušné receptory (najčastejšie na povrchu fagocytov), čím spúšťajú ďalšiu kaskádu reakcií (opsonizácia a stimulácia fagocytózy, degranulácia bazofilov a mastocytov a pod.). V súčasnosti sú známe aj dedičné ochorenia poruchy komplementu, ako napríklad systémový lupus erythematosus (C1,C4), sklerodermia (C9), chronické pyogénne infekcie (C1,C4) a pod.

Väzba komplementu

V týchto testoch sa meria protilátka v sére alebo cerebrospinálnej tekutine, ktorá sa viaže s komplementom. Používajú sa pri diagnostikovaní vírusových ochorení a mykóz, hlavne pri podozrení na coccidiomykózu. Vzorka sa inkubuje so známym množstvom komplementu a meria sa množstvo fixovaného antigénu, ktorý je vlastne cieľom pre väzbu protilátky. Stupeň väzby s komplementom tak nepriamo určuje množstvo protilátky vo vzorke. Týmto spôsobom je možné merať titer protilátok typu IgM a IgG. Metóda je síce pomerne presná, ale má obmedzené použitie, je náročná na prácu a vyžaduje si neustálu kontrolu.



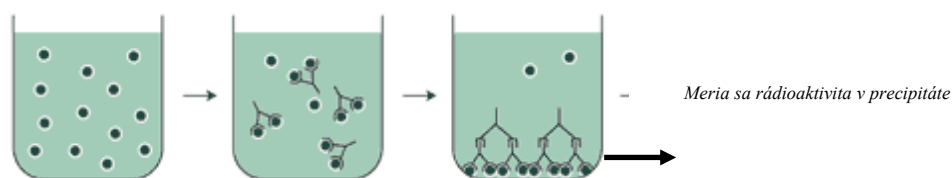
Obrázok 17. Nepriamy Coombsov test sa využíva napríklad pri prenatalnom stanovení Rh faktora.

Metódy so značeným antigénom/protilátkou

Rádioaktívne značenie (RIA – Radioimmunoassay, IRMA - Immunoradioassay)

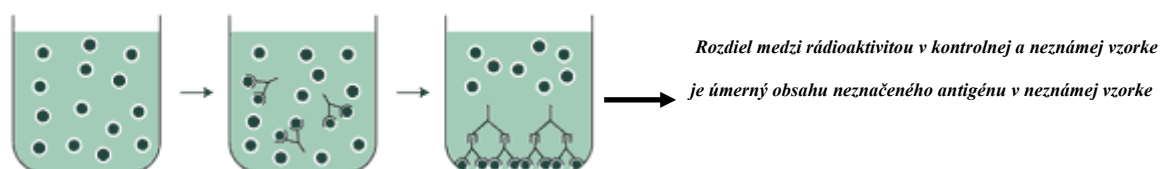
Pri meraní RIA metódou sa používa známe množstvo rádioaktívne značeného antigénu. Najčastejšie sa používa značenie gama žiaričom – I^{125} na aminokyseline tyrozíne. Takto značený antigén sa zmieša so známym množstvom príslušnej protilátky a vznikne väzba. Potom sa pridá do zmesi sérum pacienta, v ktorom je neznáme množstvo neznačenej protilátky. Táto súťaží o väzbové miesta so značeným antigénom. Čím viac protilátok obsahuje vzorka séra pacienta, tým viac rádioaktívne značeného antigénu zostáva nenviazaného. Po oddelení voľného rádioaktívne značeného antigénu zo zmesi sa zmeria aktivita v gama počítachi. Z údajov merania a po použití štandardov so známou koncentráciou sa dá potom zostrojiť **väzbová krivka**, z ktorej sa odvodí množstvo antigénu v sére pacienta.

Kontrola



Známe množstvo rádioaktívne značeného antigénu	pridá sa presná koncentrácia protilátky	po pridání anti-imunoglobulínu vzniká komplex - precipitát
--	---	--

Neznáma vzorka



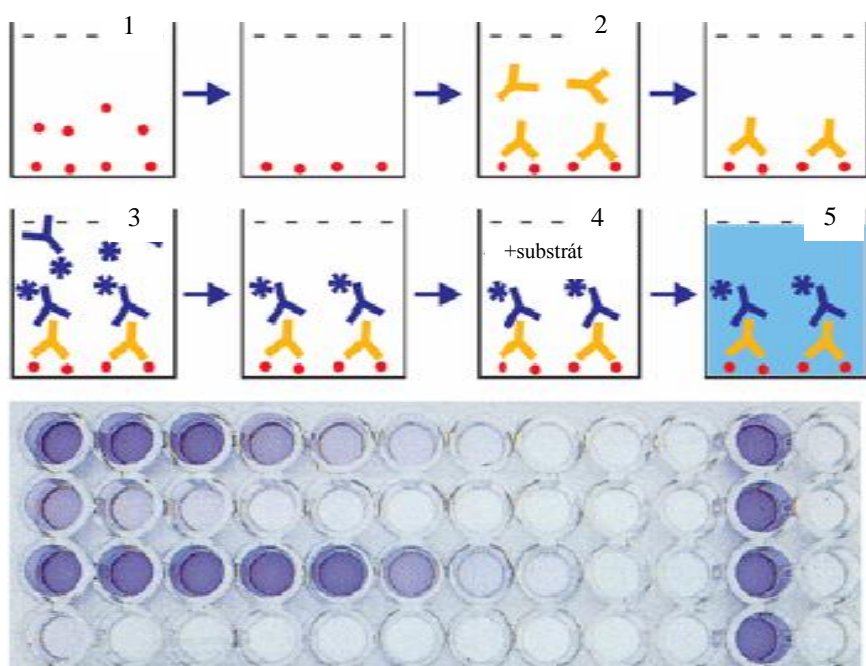
Známe množstvo rádioaktívne značeného antigénu sa zmieša s neznámym množstvom neznačeného antigénu	neznačený antigén súťaží o väzbové miesta so značeným	po pridání anti-imunoglobulínu vzniká komplex – precipitát so značeným aj neznačeným antigénom
--	---	--

Obrázok 18. Princíp RIA metódy.

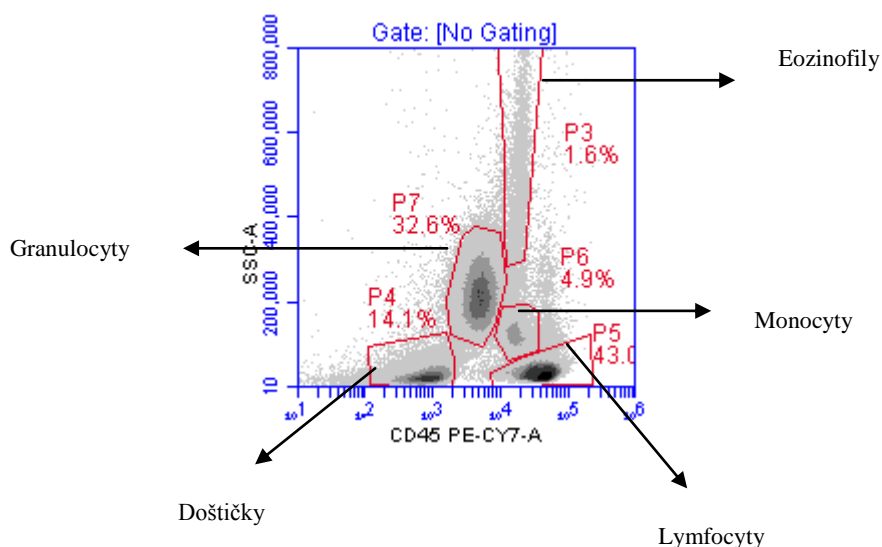
IRMA metóda je založená na priamej väzbe rádioaktívne značenej protilátky s antigénom.

Enzýmové značenie (EIA – „enzyme immunoassay“, ELISA – „enzyme-linked immunosorbent assay“)

Tieto metódy pracujú na princípe **väzby protilátok**, ktoré majú na sebe naviazané enzýmy ako značku. Výsledok reakcie sa potom meria ako farebná reakcia po pridaní enzýmového substrátu, alebo sa pridá ešte sekundárna protilátka, ktorá nesie fluorescenčnú alebo chemiluminiscenčnú značku (sendvičová ELISA). Táto metóda je pomerne jednoduchá a pomocou komerčne dodávaných súprav je možné naraz stanoviť veľké množstvo vzoriek.



Obrázok 19. Princíp ELISA testu. 1- jamky sú potiahnuté s antigénom, 2-pridanie vzorky séra, 3- pridanie protilátky značenej s enzýmom, 4-pridanie substrátu pre enzým, 5-odčítanie farebnej reakcie. Metódy založené na protilátkach s naviazaným enzýmom sú vysoko citlivé (1 pg/ml), rýchle a presné. Automatizácia umožnila to, že sa tieto metódy stali skriningovými.



Obrázok 20. Príklad identifikácie piatich typov krvných buniek pomocou fluorescenčne značených protilátok na prietokovom cytometri.

Prietoková cytometria

Je založená na **analýze mikroskopických častíc** (bunky, chromozómy), ktoré prechádzajú detekčným systémom v prúde roztoku. Umožňuje to simultánnu analýzu viacerých parametrov a charakterizáciu tisícov častíc za sekundu. Detekčný systém sa obvykle skladá z jedného alebo viacerých laserov, ktoré spôsobujú excitáciu fluorochrómov naviazaných na protilátkach do vyššieho energetického stavu a emisiu fotónov. **Prietoková cytometria** je rutinnou a jednou z najčastejšie používaných vyšetrovacích metód, hlavne pri diagnostike nádorov. Z hľadiska imunológie je možné stanoviť priamu väzbu fluorescenčne značeného antigénu na povrch buniek. V súčasnosti je komerčne dostupné veľké množstvo fluorescenčne značených protilátok. Moderné prietokové cytometre majú vyšší počet detektorov a umožňujú simultánne viacnásobné značenie protilátkami. Niektoré z nich vedú digitálne zobrazit jednotlivé bunky a lokalizovať fluorescenčný signál priamo na ich povrchu. Z hľadiska imunológie je tak možné nielen stanoviť imunologický stav, ale urobiť aj imunofenotypizáciu hematopoietických buniek v rozdielnom štádiu dozrievania. Táto metóda sa používa napríklad pri odhaľovaní línií leukemických buniek, alebo lymfómových

nádorov. **FACS** („*Fluorescence Activated Cell Sorting*“) je špeciálnym druhom cytometrie, ktorá umožňuje triediť heterogénne zmesi buniek pomocou kombinácie svetelného a fluorescenčného skenovania do dvoch alebo viacerých oddelených zásobníkov.

Výšetrovacie metódy pre alergiu a autoimunitné ochorenia.

Alergia sa dá definovať ako porucha imunitného systému, pri ktorej nastáva silná antigénna reakcia voči bežným, neškodným látkam v okolitom prostredí ľudského organizmu. Tieto látky sa potom nazývajú alergénmi. Podľa vstupnej brány do organizmu ich môžeme rozdeliť na potravinové (tráviaci trakt), inhalačné (dýchacia sústava) a kontaktné (koža).

Základným prvkom alergickej reakcie je **imunoglobulín E**, alebo IgE, ktorého unikátnou vlastnosťou je, že môže byť špecifický proti stovkám rozdielnych alergénov. Okrem tejto klasickej reakcie sú dnes už známe aj **alergény**, ktoré stimulujú syntézu špecifických IgA, IgG a IgM. Osobitnou problematikou je astmatický zápal, ktorého markermi sú eozínový kationický proteín (ECP) a tryptáza.

Kožné testy

V súčasnosti sú rozšírené dva typy kožných testov . „Prick“ testy spočívajú v aplikácii malého množstva potenciálneho alergénu ihlou do spodných vrstiev pokožky. Pozitívna reakcia sa prejaví sčervenaním a kvantifikuje sa meraním veľkosti postihnutej plochy. Druhým typom sú náplaste s aplikáciou alergénov, ktoré pôsobia na pokožku niekoľko dní. Efekt sa zisťuje rovnako ako u predošlého typu testov. Tieto metódy sa v súčasnosti vo svete využívajú už len obmedzene pre množstvo nevýhod. Zásadnou je nebezpečenstvo pre precitlivelych pacientov, u ktorých môže nastať anafylaxia. Druhou nevýhodou je nepresnosť. Reakcia pokožky môže totiž závisieť aj od mnohých iných faktorov (vek, pohlavie, rozdiely v hormonálnych hladinách, atď.).

In vitro stanovenie špecifických imunoglobulínov

Prítomnosť špecifických imunoglobulínov sa dá rýchlo a presne stanoviť vo vzorke séra pacienta. Okrem už skôr spomínaných ELISA meraní je v súčasnosti mnoho komerčne dostupných prístrojov a systémov, ktoré merajú väzbu enzýmovu alebo fluorescenčne značených antigénov s protilátkami v sére pacienta. Množstvo protilátky je definované v jednotkách alergénu (AU-WHO). Za obvyklú hranicu pre alergickú reakciu sa považuje 0,35 kU/l a viac (tzv. „cut-off“ hodnota). Tieto metódy sú ďaleko presnejšie a štandardnejšie ako kožné testy, pričom nezaťažujú pacienta.

Stanovenie hladiny tryptázy má v alergológii nezastupiteľnú úlohu. Mastocyty, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu v alergickej reakcii, sekretujú po aktivácii tryptázu a histamín. Zvýšená hladina tryptázy u pacientov kopíruje priebeh anafylaxie spôsobenej liekmi, hmyzím bodnutím, alebo potravinami.

Astmatickí pacienti trpiaci eozinofilovým zápalom majú zvýšenú hladinu ECP v sére a iných telových tekutinách ako sú bronchiálna alveolárna tekutina, nazálne sekréty a sputum. Množstvo sérového ECP sa považuje za objektívnu mierku pre zápalový stav v astme. Udáva informáciu nielen o miere zápalu, ale využíva sa aj na monitorovanie účinnosti kortikosteroidnej terapie. Za pozitívne hodnoty pre zápalový proces sa považujú 11,4 µg/l ECP a viac. Tento údaj platí pre dospelých a deti staršie ako 4 roky.

Diagnostika autoimunitných ochorení

Pojem **“autoimunitné ochorenie, alebo autoimúnne ochorenie”** sa týka viac ako 80-tich závažných chronických ochorení, ktoré postihujú takmer všetky ľudské orgány. Postihujú nervový systém, gastrointestinálny trakt, endokrinný systém, kožu, spojivové tkanivá a cievny systém. Všetky tieto ochorenia majú spoločný znak. Imunitný systém jedince sa obráti proti

vlastným orgánom, ktoré má chrániť. Autoimúnne ochorenia sú pre svoju zložitosť dodnes najmenej objasneným fenoménom. Najčastejším prejavom sú ochorenia štítnej žľazy, reumatoidná artritída, diabetes a systémový lupus erytematosus. Iba tieto ochorenia predstavujú štvrtú najčastejšiu príčinu chorobnosti v Európe a USA. Symptómy autoimunitného ochorenia môžu byť veľmi variabilné, čo značne sťažuje jednoznačnú diagnostiku. Pre dlhšie udržanie zdravého života pacientov a oddialenie invalidizácie je preto dôležitá včasná a spoľahlivá diagnostika.

Príklady najčastejšie vyšetrovaných protilátok pri autoimunitných ochoreniach.

Ochorenie	Markerové protilátky
Ochorenia spojivových tkanív	dsDNA, U1RNP, Sm,SS-A/Ro, RNP70, SS-B/La, Scl-70, CENP-B, Jo-1, kardiolipín IgG
Anti-fosfolipidový syndróm	kardiolipín IgA, β -glykoproteín IgG a IgM
Vaskulitída	MPO, ANCA,PR3 ANCA, GBM, TG
Ochorenia štítnej žľazy	TPO, TG
celiakia	tissue transglutaminase IgG,IgA, M2,LKM
	Parietal cell antibodies, sperm antibodies

Jedným z najrozšírenejších ochorení autoimunitného charakteru je systémový lupus erythematosus (SLE), ako aj iné atypické dermatitídy a atopické exémy.

Autoprotilátka	Ochorenie a prevalencia	Klinický význam
dsDNA	Aktívna SLE* s renálnym poškodením viac ako 95%, bez renálneho poškodenia 50-70%, neaktívna SLE viac ako 40%	špecifický marker pre SLE, koreluje s aktivitou ochorenia a mierou poškodenia tkaniva dsDNA protilátky sú asociované so zvýšeným rizikom nefritídy
RNP (70kDa,A,C)	SLE 30-40% MCTD *100%	U1 snRNP protilátky indikujú priaznivú prognózu pre renálne poškodenie, aj v prípade keď sa nájdu spolu s Sm. MCTD je definovaná vysokými hladinami anti-U1

		snRNP
SmD	SLE 10-30%	vysoko špecifický marker pre SLE
SS-A/Ro (52 a 60 kD)	SLE 40-50% SS* 60-70% matka dieťaťa s neonatálnym lupus	vysoké riziko neonatálneho lupus ak má matka SS-A/Ro (hlavne proti 52 kD) a SS-B/La protilátky
SS-B/La	SLE 5-10% SS 25-50% matka dieťaťa s neonatálnym lupus 60%	SS-B/La protilátky sú spojené vždy s protilátkami pre anti-SSA a sú špecifickejšie pre Sjörgrenov syndróm ako anti-SS-A/Ro
Scl-70	skleroderma 20-60%	vysoko špecifický marker pre sklerodermu
Centroméra (CENP-B)	CREST* 20-35%	prítomné u pacientov so sklerodermou a u pacientov s primárnou biliárnou cirhózou
Jo-1	polydermatolýza	pacienti majú často poškodené pľúca, mávajú viaceré ochorenia so slabou odpoveďou na terapiu

*SLE-systémový lupus erythematosus, MCTD-„mixed connective tissue disease“,

SS- Sjörgrenov syndróm, CREST-limited scleroderma

Hmotnostná spektrometria (mass spectrometry, MS)

Je skôr analytickou metódou založenou na princípe merania pomeru hmoty a náboja elektricky nabitých častíc. V biológii a biochémmi sa využíva na analýzu primárneho zloženia a štruktúry organických molekúl. Typický MS experiment obsahuje tieto kroky:

1. Purifikácia vzorky do najvyššej možnej čistoty – u proteínov je to obvykle chromatografia a 2D elektroforéza.
2. Vzorka sa nanesie do prístroja a vaporizuje

Jednotlivé zložky vzorky sa ionizujú a vytvoria sa z nich elektricky nabité častice. Z rôznych metód sa pre proteíny a peptidy v tekutom a pevnom skupenstve najčastejšie používajú dve. Je to tvorba elektrospreja pomocou lúča elektrónov a tzv. MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization). MALDI metóda je vhodnejšia pre väčšie organické molekuly proteínov a cukrov, ktoré sa môžu metódou elektrospreja poškodiť. Ionizácia sa uskutočňuje

pomocou laserového lúča a matrix chráni biomolekuly pred zničením. Ako matrix sa používajú kryštalické molekuly, napr. kyselina gentisová (DHB) alebo kyselina ferulová a pod. Najpoužívanším prístrojom je MALDI/TOF (time-of-flight mass spectrometer)

3. Ionizované častice sa rozdelia podľa pomeru hmotnosť:náboj v elektromagnetických poliach (iónová pasca, ion trap)
4. Častice sú detegované kvantitatívne
5. Softvér spracuje signál na hmotnostné spektrum

Rôzne modifikácie MALDI metódy sa využívajú v biochémií pri identifikácii proteínov, cukrov a oligonukleotidov. MALDI/TOF sa už využíva aj v mikrobiológii na identifikáciu baktérií, plesní a kvasiniek. Ak sa bakteriálna kolónia rozotrie priamo na podložke a pokryje matrixom, vzniknuté spektrum môže softvér porovnať s uloženými spektrami a identifikovať tak priamo mikroorganizmus. Táto metóda sa v súčasnosti už stáva v mikrobiologických laboratóriách štandardom.

Záver

Aj keď v súčasnosti nemusíme čeliť ochoreniam, ktoré sa vyskytovali v dobách našich prarodičov, stále väčšou hrozbou sú tzv. civilizačné ochorenia, najmä kardiovaskulárneho systému a onkologické ochorenia. Na týchto ochoreniach sa čiastočne podieľa genetická predispozícia, ale vo veľkej miere nesie zodpovednosť zlý životný štýl (stres, dietetické návyky, eliminovanie pohybu, atď.). Mnohé tieto ochorenia sa prejavajú až v pokročilom štádiu, čo rapídne znižuje šancu na ich vyliečenie. Preto je včasná diagnostika jedným zo základných cieľov, pretože nielen zvýši šancu pacienta na vyliečenie, ale ekonomické dopady liečby sú nižšie. Uvedené metodiky sú síce základnými metódami, ktoré sa používajú v diagnostike mnohých ochorení, ale určite nie sú všetky. Rapídne sa rozvíjajúce poznatky

v oblasti biochemie, molekulární biologie, fyziologie, atd'. stále umožňují rozvoj nových, citlivějších metod.

Použitá literatura

- Darnell J.E.: Molecular cell biology. Ed by Lodish H.F. and Baltimore D, Scientific American Books 1986, ISBN 0-7167-1448-5
- Dorland's illustrated medical dictionary, 26th ed., Elsevier 2003, ISBN 0-8089-228-2
- Metzler D.E.: Biochemistry: The Chemical Reactions of Living Cells. Academic Press inc. (London) Ltd, 1977, ISBN 0-12-492530-8
- Gassen H.G., Sachse G.E., Schulte A.: PCR, Gustav Fisher Verlag, Stuttgart, 1994, ISBN 3-437-20509-9
- Hořejší V.: Základy imunologie. Triton, 2000, ISBN 80-7254-215-8
- Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 Apr;162(1):156-9
- Shoenfeld Y., Fučíková T., Bartůňková J.: Autoimunita vnitřní nepřítel. Grada 2007, ISBN 978-80-247-2044-9
- Šmarda J., Doškař J., Pantuček R., Ružičková V., Koptíková J.: Metody molekulární biologie. Masarykova univerzita 2010, ISBN 9-7880-2103-841-7