

Sborník textů

**Vybrané vyšetřovací metody
v molekulární genetice a cytogenetice**

Projekt Metabolické vzdělávací centrum
CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048

Ústav dědičných metabolických poruch
Všeobecná fakultní nemocnice v Praze

Praha 2008

Pořadatel

Sylvie Šťastná, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Autoři

Hana Hartmannová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Daniel Chudoba, Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Lenka Mrázová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Lenka Nosková, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Drahuše Novotná, Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Helena Trešlová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Hana Vlášková, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Petr Vyleťal, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Obsah

Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice	5
Odběr biologického materiálu (Helena Trešlová).....	7
Izolace DNA (Hana Vlášková, Helena Trešlová).....	8
Izolace RNA (Hana Hartmannová, Lenka Nosková).....	10
Reverzní transkripce (Hana Vlášková, Helena Trešlová).....	11
PCR (Hana Vlášková, Helena Trešlová)	12
Varianty PCR (Hana Vlášková, Helena Trešlová)	15
Restrikční analýzy (Hana Vlášková, Helena Trešlová)	19
Elektroforéza v agarózovém gelu (horizontální) (Hana Vlášková, Helena Trešlová).....	21
Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (vertikální) (Helena Trešlová, Petr Vyleťal).....	23
Sekvenování nukleových kyselin (Helena Trešlová)	24
Technologie DNA čipů (Hana Hartmannová, Lenka Nosková)	27
Molekulární klonování (Lenka Mrázová)	29
Vybrané vyšetřovací metody v cytogenetice	31
Cytogenetika, karyotyp, chromozomální aberace (Drahuše Novotná, Daniel Chudoba).....	33
Tkáně pro cytogenetické vyšetření (Drahuše Novotná, Daniel Chudoba).....	36
Vizualizace chromosomů (Drahuše Novotná, Daniel Chudoba).....	37
In situ hybridizace, FISH (Drahuše Novotná, Daniel Chudoba).....	39
Nádorová cytogenetika (Drahuše Novotná, Daniel Chudoba).....	42
Cytogenetická preimplantační diagnostika (Drahuše Novotná, Daniel Chudoba).....	43
Laboratoř pro tkáňové kultury (Daniel Chudoba, Drahuše Novotná).....	44
Tkáňové kultury (Daniel Chudoba, Drahuše Novotná).....	46
Transport tkáňových kultur (Daniel Chudoba, Drahuše Novotná).....	49
Kryoprezervace tkáňových kultur (Daniel Chudoba, Drahuše Novotná).....	50

**Vybrané vyšetřovací metody
v molekulární genetice**

Odběr biologického materiálu

Helena Trešlová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Mutační analýza může být provedena v jakýchkoliv lidských buňkách obsahujících genetickou informaci v podobě dvoušroubovice DNA, která je uložena buď v buněčných jádrech (jaderná DNA) nebo v mitochondriích (mitochondriální DNA).

V naší laboratoři se vyšetřuje pouze jaderná DNA.

Nejčastěji je analýza mutací prováděna na úrovni **genomové DNA**. Pro tyto účely je nejvhodnějším materiálem 5-10 ml nesrážlivé celé krve s etylendiamintetraacetátem (EDTA) zaslané při pokojové teplotě (při transportu na delší vzdálenost je vhodnější DNA z krve extrahovat). Díky dobré stabilitě dvouvláknové DNA je možné celou krev uchovávat 1-2 dny při pokojové teplotě nebo chladniče, na několik týdnů může být i zamrazena. Genomovou DNA lze získat i z menšího množství krve (několik stovek mikrolitrů), stejně tak z jiných materiálů, např. suché krevní kapky, moče, slin a různých tkání. Získání DNA z těchto vzorků však může být méně spolehlivé.

Mutační analýza se v naší laboratoři provádí také na úrovni **komplementární DNA (cDNA)**, která se získá z jednovláknové mediátorové RNA (mRNA) metodou reversní transkripce (viz kapitola Reversní transkripce). Molekula mRNA je získána z buněk, v nichž je cílový gen exprimován, pro svou nestabilitu je ale pro genetickou analýzu nevhodná. Komplementární DNA je již stabilní a lze ji uchovávat při teplotě -80°C .

Biologický materiál pro genetickou analýzu

Nesrážlivá krev – 5-10 ml v EDTA, uchování a transport při pokojové teplotě, v případě izolace pouze genomové DNA možné zamražení. Je vhodná pro izolaci genomové DNA i mRNA pomocí komerčních kitů (např. QIAGEN) (viz kapitoly Izolace DNA a RNA).

Moč – 50 ml, uchování a transport při teplotě do 4°C . Izolace genomové DNA z odloučených epitelálních buněk močových cest komerční kolonkou (např. QIAGEN).

Močový sběr – při sběru nechávat v chladu, změřit objem a dobu sběru, promíchat a odlít 50 ml.

Sliny – odběr alespoň 1 ml vzorku, promytí fyziologickým roztokem a následná izolace genomové DNA standardními metodami.

Fibroblasty – pro úspěšnou analýzu je potřeba alespoň tři 75cm^2 lahví (záleží na tom, jak jsou fibroblasty konfluentní). Fibroblasty se promyjí 5-7 ml PBS (Phosphate Buffered Saline), poté seškrábou a stočí do pelety, ze které se standardními metodami izoluje genomová DNA a v případě exprese vyšetřovaného genu ve fibroblastech i mRNA.

Tkáně – játra, sval apod. Z parafinových bločků lze po odparafinování xylenem izolovat genomovou DNA. Ze tkání zamražených chladem nebo z tkání zamražených dusíkem a poté rozdrcených na prášek získáme homogenát, ze kterého lze vyizolovat jak genomovou DNA tak i mRNA (opět ale pouze tehdy, pokud je ve vyšetřované tkáni příslušný gen exprimován).

Choriové klky nativní i kultivované – biopsie choriových klků se provádí ve 13.-14. týdnu těhotenství.

Amniocyty kultivované – odběr plodové vody se provádí v 16.-18. týdnu těhotenství.

Materiál pro genetickou analýzu je možné do laboratoře zaslat pouze po předchozí domluvě.

Izolace DNA

Hana Vlášková, Helena Trešlová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Genomová eukaryotická DNA může být izolována z jaderných buněk tkání a orgánů, krevních buněk a buněk rostoucích v buněčné kultuře.

Cílem purifikace je rozdělení komplexu DNA-protein a extrakce čisté, nerozštěpené DNA bez příměsí (RNA, bílkoviny). Rozrušení komplexu DNA-protein se provádí přidáním detergentu (SDS-dodecylsírán sodný), proteinázy a chelatačního činidla (EDTA - kyselina ethylendiaminotetraoctová).

Prvním krokem je vždy **lýza buněk**, ze kterých chceme nukleové kyseliny získat. U živočišných buněk stačí obvykle rozpuštění biomembrán a denaturace proteinů detergentem. Pro lýzu pevných tkání musí být použita nějaká forma mechanické síly, např. protřepáváním na vortexu se skleněnými kuličkami, drcením tkáně zmrazené tekutým dusíkem v třecí misce apod. K lyzačnímu roztoku se přidává enzym proteináza K, který štěpí bílkoviny, včetně histonů vázaných na strukturu DNA. Buněčný obsah včetně nukleových kyselin se z lyzovaných buněk uvolní do pufovaného roztoku, který kromě detergentů obsahuje EDTA. Ta komplexně váže ionty vápníku, které jsou potřebné jako kofaktor nukleáz.

Dalším krokem je pak **precipitace DNA** etanolem a její následné **promytí**. Nakonec se DNA **rozpustí** ve vodě nebo vhodném pufru (např. TE).

Čistota a koncentrace DNA se zjistí **spektrofotometricky** (např. na přístroji NanoDrop, www.nanodrop.com). Nukleové kyseliny absorbují UV záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo 260 nm, zatímco proteiny v oblasti okolo 280 nm. Stupeň čistoty nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při 260 a 280 nm (ideální poměr 260/280 = 1,8). Při znečištění vzorku proteiny bude vypočtený poměr výrazně nižší.

V současné době se v naší laboratoři pro **izolaci DNA** používají **tři metody**, které se od sebe liší použitým organickým nebo anorganickým rozpouštědlem. První dvě využívají organická rozpouštědla (fenol-chloroformová extrakce a metoda adsorpce na pevný podklad), třetí metodou je vysolování (precipitace proteinů pomocí NaCl).

Fenol-chloroformová extrakce nukleových kyselin

Fenol-chloroformová metoda extrakce ponechává nukleové kyseliny rozpuštěné ve vodném prostředí (pufru) a odstraňuje ostatní složky lyzátu, především proteiny. K lyzátu je přidána směs fenolu, chloroformu a izoamylalkoholu. Chloroform je organické rozpouštědlo a nemísí se s vodným roztokem buněčného lyzátu, takže se směs rozdělí na dvě fáze – horní vodnou a dolní organickou. Protřepáváním dochází k mísení fází, při kterém fenol sráží proteiny přítomné ve vodném lyzátu. Izoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu, takže po skončení protřepávání přejde fenol do chloroformové fáze. Po protřepání je roztok odstředěn pro dokonalé oddělení fází. Na rozhraní mezi fázemi se obvykle objeví bílý prstenec sražených proteinů (tzv. interfáze). Horní vodná fáze obsahuje nukleové kyseliny a je přenesena do nové čisté zkumavky. Z přečištěného vodného roztoku je možné nukleové kyseliny vysrážet přidáním koncentrovaného etanolu. Precipitovaná DNA se navine na plastový nebo skleněný háček (obr. 2). S nukleovými kyselinami se srážejí (koprecipitují) i soli, které zvyšují účinnost srážení nukleových kyselin a dávají peletě bílé zbarvení. Soli je

pak potřeba odmyt 70% etanolem. Čisté nukleové kyseliny je možné po odsátí supernatantu rozpustit ve vodě nebo ve vhodném pufru.

Adsorpční metoda

Adsorpční metody využívají schopnost nukleových kyselin adsorbovat se na povrchy z oxidu křemičitého (silikát) v přítomnosti chaotropní soli (jodid sodný nebo ionty guanidinu). Síla vazby závisí na nukleové kyselině (DNA či RNA), na iontové síle a pH roztoku. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu s vysokými výtěžky. Využívá ji většina komerčních kitů (např. námi používaný QIAamp DNA Mini Kit, www.qiagen.com). Purifikace tímto kitem nevyžaduje fenol-chloroformovou extrakci ani alkoholovou precipitaci. DNA je eluována AE pufrem nebo vodou a může být okamžitě použita pro další metody (např. PCR).

Vysolovací metoda

Metoda vysolování obchází použitím organických rozpouštědel popsaných v předchozích metodách. Nejdostupnější materiál, krev, obsahuje kromě jaderných buněk, leukocytů, i bezjaderné buňky, erythrocyty. Nejprve se proto lyzují membrány erythrocytů amonium chloridovým pufrem. Dochází k selektivní hemolýze erythrocytů resorpcí NH_4Cl . Leukocytární DNA se izoluje pomocí rozpuštění buněčné membrány enzymem proteinázou K, která má vyšší aktivitu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného (SDS). Následně se přidá NaCl v pufru, kterým se lyzují jaderné membrány a vysolením zbývajících proteinů a proteinázy K vzniká bílý precipitát. K supernatantu se přidá 96% etanol a po odstředění se na dně zkumavky objeví mléčně zkalený sediment, tzv. peleta, která se omyje 70% etanolem a nechá se oschnout. Nakonec se rozpustí v TE pufru nebo ve vodě.

Izolace RNA

Hana Hartmannová, Lenka Nosková

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Základy metody izolace celkové RNA byly popsány v práci autorů: Chomczynski a Sacchi, *Anal. Biochem.*, 162: 156-159, 1987.

Buňky jsou lyzovány nebo homogenizovány v přítomnosti roztoku **fenolu a guanidin isothiokyanátu**. Přidání chloroformu a následná krátká centrifugace vedou k separaci vzorku do tří fází: 1. vodní fáze, obsahující RNA, 2. interfáze, obsahující DNA a 3. organické fáze, obsahující proteiny. RNA je izolována z vodní fáze precipitací pomocí izopropanolu. Peleta RNA je promyta 75% etanolem, vysušena a rozpuštěna ve vodě nebo v pufru, podle následného zpracování.

Dalším možným způsobem izolace RNA je použití **kitu firmy QIAGEN**. Ten je založen na kombinaci vazebných vlastností silikonové membrány s centrifugací. Biologický materiál je nejprve lyzován nebo homogenizován v přítomnosti denaturujícího pufru s obsahem guanidinium thiokyanátu. Přidání etanolu zajišťuje odpovídající podmínky pro vazbu RNA na membránu. Po promytí je RNA eluována do příslušného roztoku.

Problémem při izolaci RNA je existence všudypřítomných RNáz (enzymy katalyzující hydrolýzu RNA), které je obtížné inhibovat. Z tohoto důvodu práce s RNA vyžaduje zachovávání velmi sterilních podmínek. Vzorky RNA je třeba i po izolaci chránit proti působení RNáz skladováním při -70 °C, příp. i přidáním specifického inhibitoru RNáz (RNasin, případně heparin).

Kvalita RNA je kontrolována elektroforeticky na Agilent 2100 bioanalyseru a spektrofotometricky na NanoDropu.

RNA lze užít pro řadu aplikací – pro reverzní transkripci, RT PCR, pro microarray experimenty a další.

Reverzní transkripce

Hana Vlášková, Helena Trešlová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Proces reverzní transkripce je, jak již vyplývá z názvu, opačným krokem „normální“ transkripce, kdy se v buněčném jádře přepisuje genomová DNA přes primární transkript (hnRNA či pre-mRNA) do messengerRNA (mRNA). Maturací hnRNA na mRNA dochází k tzv. vystřížení intronů (úseky mezi kódujícími kusy genu, tzv. exony). Proces „normální“ transkripce a následné translace do proteinu označil roku 1958 Francis Crick jako Centrální dogma molekulární biologie. Za objev RT byla roku 1975 Howardu Teminovi a Davidu Baltimorevi udělena Nobelova cena.

Reverzní transkripce (RT) je proces katalyzovaný enzymem RNA-dependentní-DNA-polymerázou (reverzní transkriptáza), při němž se podle templátu RNA syntetizuje cDNA (komplementární DNA). Molekuly mRNA se podílejí pouze 1 – 2 % na celkovém množství izolované RNA (převážnou část tvoří rRNA). Syntéza probíhá vždy za pomoci primeru, a to buď oligo-dT primeru, který nasedá na poly-A úsek mRNA, nebo specifických oligonukleotidů pro syntézu vybrané určité mRNA nebo směsi náhodných hexanukleotidů.

Reverzní transkripce se využívá v **genovém inženýrství**, neboť pomocí ní lze využít funkční mRNA k syntéze cDNA. Vlastní RNA se v genovém inženýrství nepoužívá z důvodu, že je snadno degradována všudypřítomnými RNázami. Pro zabránění degradace RNA se při RT do reakce přidává Rnasin. Přepisu buněčných mRNA do cDNA a jejího následného namnožení pomocí polymerázové řetězové reakce (viz kapitola PCR) se používá při studiu exprese genetické informace, k detekci infekčních agens a detekci genetických nemocí. Analýza cDNA poskytuje informaci o správnosti setřihu a o event. vzniku náhradních intronových sestřihových míst způsobených záměnou (mutací) nukleotidu mimo kódující úsek genu, tedy v intronu.

Reverzní transkripce je významným krokem **životního cyklu retrovirů** (např. virus HIV), které mají svou genetickou informaci uloženou v molekule RNA, reverzní transkripce ji transformují do DNA a tu pak inkorporují do chromosomu hostitelské buňky.

Mezi používané reverzní **transkriptázy** patří M-MuLV (z Moloneyho myšího leukemického viru), AMV (z ptačího myeloblastického viru) a SuperScript (z *pol* genu Moloneyho myšího leukemického viru). Optimální reakční teploty se liší: M-MuLV = 37°C, AMV = 42°C, SuperScript = 42°C.

V naší laboratoři se pro diagnostické i výzkumné účely používá reverzní transkriptáza SuperScript™ II a primer Oligo(dT)₁₂₋₁₈ od firmy Invitrogen.

PCR

Hana Vlášková, Helena Trešlová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction - PCR) je metoda molekulární biologie pro enzymatickou replikaci DNA in vitro bez použití živých organismů.

Jako templát se používá malé množství DNA, které je v průběhu cyklické reakce o třech teplotních fázích exponenciálně amplifikováno. Metoda PCR se obvykle využívá v lékařských a biologických výzkumných laboratořích a příbuzných oborech pro diagnostiku dědičných onemocnění, infekčních onemocnění, určení otcovství, identifikaci osob v kriminalistice, klonování genů a další. Metoda PCR byla vynalezena americkým biochemikem Kary Banks Mullisem, který byl za tento objev v roce 1993 oceněn Nobelovou cenou.

PCR v praxi

PCR se používá na amplifikaci specifické oblasti DNA. Mohou to být jednotlivé geny, části genů nebo nekódující oblasti, jejichž délka obvykle nepřesahuje 10 kb. Za určitých podmínek mohou být touto metodou amplifikovány fragmenty dlouhé až 47 kb, což je stále malá velikost v porovnání s chromozomální DNA eukaryotických buněk, např. lidská buňka obsahuje 3000 Mb.

Jednotlivé komponenty PCR jsou:

1. **DNA templát** - dvouvláknová genomová či komplementární DNA
2. **dva oligonukleotidové primery** - ohraničují začátek a konec amplifikované oblasti (viz odstavec o primerech)
3. **Taq polymeráza** (nebo jiná tepelně odolná polymeráza) - DNA-polymeráza je schopná syntetizovat komplementární vlákno podle templátu jednovláknové DNA tak, že přidává k existujícímu úseku druhého vlákna nové nukleotidy ve směru 5' > 3' (viz odstavec o polymerázách)
4. **deoxynukleotid-trifosfáty** – za účasti DNA polymerázy jsou zabudovány do nového DNA řetězce
5. **pufr** - poskytuje stálé chemické prostředí pro DNA polymerázu

Polymerázy

Taq DNA polymeráza byla získána z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (1976) a úspěšně použita v PCR reakci pro svou odolnost a aktivitu při vysokých teplotách.

Pokud ovšem používáme klasickou Taq-polymerázu, má PCR svá omezení. Taq polymeráza nemá tzv. korektorskou aktivitu (3'→5'). Při syntéze nového vlákna dělá chyby, které není schopná opravit. Protože v PCR je produkt předchozího cyklu syntézy templátem pro další cykly syntézy, tyto chyby se hromadí. Taq polymeráza také nedokáže efektivně syntetizovat produkty delší než cca 3-15 tisíc párů bází.

Obě nevýhody lze obejít použitím termostabilních polymeráz s korektorskou aktivitou, ty jsou ale méně výkonné, takže se s výhodou používají směsi Taq-polymerázy a termostabilní polymerázy s korektorskou aktivitou, které se ve svých funkcích doplňují (např. KlenTaq-DeepVent).

Proces PCR reakce probíhá v **termocykleru**, což je přístroj, který dokáže přesně střídat jednotlivé teplotní kroky reakce. Z důvodu možného odpaření reakčního mixu (obvyklý objem je v rozmezí 15-100 µl v 1 mikrozkuhavce) se používají termocyklery s vyhřívaným víkem.

Tabulka 1: Typy termostabilních polymeráz

Polymeráza	3'→5' Exonukleáza	Zdroj a vlastnosti
Taq	Ne	Thermus aquaticus Poločas rozpadu při 95°C je 1,6 hod.
Pfu	Ano	Pyrococcus furiosus Má nejnižší chybovost z termofilních DNA polymeráz.
Vent	Ano	Thermococcus litoralis (také známá jako Tli polymeráza) Poločas rozpadu při 95°C je asi 7 hod.

Primery

Primery jsou krátké oligonukleotidy (obvykle 18 - 25 bp dlouhé), které jsou komplementární k začáteční a konečné oblasti amplifikovaného úseku DNA.

Primery nasedají na příslušnou sekvenci templátové DNA a pomocí DNA polymerázy jsou řetězce prodlužovány. DNA polymeráza nemůže iniciovat polymeraci bez přítomnosti primeru. Pokud jsou primery příliš krátké, nebo obsahují sekvenci častou v DNA templátu, nasedají nespecificky na různá místa, a tak vzniká nežádoucí směs produktů. Při navrhování primerů je též třeba se vyvarovat sekvencí, které tvoří smyčky nebo jsou navzájem komplementární. Délka a zastoupení různých nukleotidů v sekvenci primeru určuje jeho teplotu tání (melting temperature – Tm). Tato hodnota je důležitá pro optimalizaci PCR reakce – pro určení optimální teploty nasedání primerů (teplota je obvykle o 5°C nižší než vypočítaná Tm). Oba primery v páru by měly mít stejnou (nebo velmi podobnou) Tm. Pro primery o délce 15 až 40 bazí je ideální Tm 55 - 65°C. Dalším důležitým parametrem je zastoupení GC bazí v sekvenci, které by mělo být 40-60 %.

Princip PCR reakce

PCR reakce obvykle začíná úvodní denaturací templátové DNA (94 - 98°C) po dobu 1 - 10 min. Pak následuje 20 až 35 cyklů.

Každý cyklus obsahuje tři kroky (Obr. 2):

1. **denaturaci** (94 - 98°C) po dobu 10 s – 2 min.
2. **nasedání primerů** – annealing (přibližně o 5°C nižší než Tm) po dobu 15 s – 1 min.
3. **prodlužování vláken** – elongace (teplota je závislá na použité DNA polymeráze, rozmezí 68 - 72°C), doba je také závislá na použité polymeráze a na délce amplifikovaného fragmentu (20 s – 1 min.)

PCR reakce je zakončena koncovou elongací, která slouží k dokončení syntézy neúplných řetězců (3 – 15 min., někdy i déle).

Výsledek PCR amplifikace lze **detekovat na gelu** (Obr. 3), tzn. že vzorek reakční směsi nanese na start agarózového nebo polyakrylamidového gelu a pustíme elektroforézu. Pokud primery nasedaly jen na vybraná protisměrně umístěná místa, vznikly jako produkt reakce molekuly stejné sekvence a délky. Při dělení v gelu budou všechny tyto molekuly putovat stejnou rychlostí a po obarvení a zobrazení uvidíme jen jeden pruh. Není-li zobrazen žádný pruh, PCR neproběhla, pokud je zobrazeno více pruhů, tak sice PCR proběhla, ale primery nasedaly na více místech, které byly shodou okolností také orientovány protisměrně, takže došlo k amplifikaci více produktů. V takovém případě je nutné optimalizovat podmínky reakce (pozměnit teplotu a čas jednotlivých kroků).

Jaké jsou výhody a nevýhody PCR?

Hlavní výhodou PCR, ze které těží lékařská diagnostika, je její vysoká citlivost. Protože dokáže z pouhých 2 vláken vytvořit po 30 cyklech 2^{30} molekul produktu (107 milionů), stačí pro namnožení určité sekvence velmi malé množství DNA. Protože PCR funguje pouze v případě, že na templátová vlákna nasednou primery, lze toho využít např. při detekci patogenních mikroorganismů v krvi pacienta - genetická informace těchto organismů se liší od lidské, takže je možné navrhnout primery, které budou fungovat pouze v případě, že se v krvi vyskytne DNA patogena. PCR je zejména vhodná k detekci virů, mykobakterií a některých dalších mikroorganismů, u kterých není možná kultivace, nebo je příliš zdlouhavá.

Nevýhoda klasické Taq-polymerázy byla zmíněna výše.

PCR v naší laboratoři

Pro diagnostiku dědičných metabolických poruch se na našem pracovišti používá buď modifikace klasického postupu PCR např. s těmito protokoly:

MIX	1x
Buffer I	2,50
dNTP's (2mM)	2,50
MgCl ₂ (25mM)	0,30
DMSO	0,50
Taq Promega	0,60
Primer S	0,75
Primer AS	0,75
H ₂ O	16,10
gDNA	1,00
Celkem	25,00

nebo

MIX	1x
Buffer Barnes	2,50
dNTP's (2mM)	2,50
MgCl ₂ (25mM)	3,00
Klentaq	0,10
Deep Vent	0,05
Primer S	1,00
Primer AS	1,00
H ₂ O	13,85
gDNA	1,00
Celkem	25,00

Nebo v poslední době používáme protokol s PPP Master Mixem (Supermix), což je směs obsahující PPP (Taq-Purple DNA Polymeráza PCR) Master Mix s MgCl₂. Výhodou tohoto mixu je rychlá příprava reakční směsi bez nutnosti rozmrazování pufru, mix obsahuje totiž polymerázu, reakční pufr a stabilizátory, které umožňují dlouhodobé skladování při 4°C. Stačí tedy dodat primery, DNA a doplnit H₂O:

MIX	1x
Supermix	12,50
Primery S a AS	0,75
Voda do 25 ul	10,50
gDNA	1,00
Celkem	25,00

V současné době je PCR základní metodou pro prakticky všechny používané diagnostické postupy v naší laboratoři (např. RT, sekvenování, RFLP, ARMS).

Varianty PCR

Hana Vlášková, Helena Trešlová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Kvantitativní PCR v reálném čase

Principem kvantitativního PCR v reálném čase (Real-time PCR) je rychlé a přesné zaznamenávání produktů PCR bezprostředně po jejich vzniku, v každém jednotlivém cyklu reakce.

K detekci vznikajícího produktu mohou být použity různé systémy, které jsou založeny na stanovení změny intenzity fluorescenčního záření během amplifikace. Tato metoda se od klasické metody PCR (viz kapitola PCR) liší přesným určením množství produktu měřením nárůstu fluorescence během vlastní PCR reakce. Vzrůstající množství DNA ve vzorku je přímo úměrné narůstající fluorescenci.

K **měření fluorescence** se využívají dva systémy:

1. Nespecifická fluorescenční barviva, která se interkalují mezi dvouřetězcovou DNA (např. SYBR Green, LC Green).
2. Specifické fluorescenčně značené sondy, tzv. próby.

V současnosti je pro svou specifitu asi více rozšířená druhá metoda fluorescenčně značené sondy využívající exonukleázové aktivity DNA polymerázy, která má kromě schopnosti syntetizovat komplementární vlákno (viz kapitola PCR) také schopnost nasedlou sondu odbourávat.

Jako **sondy (próby)** se využívají oligonukleotidy, které se specificky váží na sekvenci mezi oběma primery (např. nejčastěji používaná TaqMan sonda). Sonda musí být navržena tak, aby hybridizovala s templátovou DNA v místě mezi místy nasednutí obou protisměrně orientovaných primerů. Sonda je na jednom svém konci označena fluorescenční látkou a na druhém konci zhášečem fluorochromu. Při syntéze komplementárních vláken hydrolyzuje DNA polymeráza TaqMan sondu, dojde k uvolnění fluorescenční látky a k nárůstu fluorescence, která je detekována a zaznamenávána v reálném čase.

Speciální **termocyklery**, určené pro kvantitativní PCR v reálném čase, jsou schopny v průběhu PCR ozařovat vzorek excitačním zářením, které vybudí fluorescenci uvolněného barviva. Tuto fluorescenci přístroj po každém cyklu změří a výsledek předá řídicímu softwaru, který zobrazuje průběžně - v reálném čase - množství uvolněné fluorescence, odpovídající množství vzniklého produktu. Výsledek reakce tak známe často dřív, než proběhnou všechny cykly. Kromě tohoto urychlení a vypuštění zdlouhavé detekce produktu na elektroforetickém gelu je tato technika hlavně výhodná tam, kde potřebujeme znát přesné množství vstupní templátové DNA - zejména u sledování exprese genů pomocí tzv. reverzní transkripce - polymerázové řetězové reakce (RT-PCR).

Nevýhodou této metody je složitější optimalizace a vysoké nároky na vlastnosti primerů, jinak jsou výsledky měření nepřesné.

PCR v reálném čase se používá i při detekci jednobodových záměn v genetické diagnostice.

U nás v laboratoři je zatím tato metoda využívána pouze pro vědecké účely a to např. pro kvantifikaci sestřihových variant na úrovni RNA, pro určování míry exprese genů nádorových buněk nebo pro kvantifikaci mitochondriální DNA.

AFLP

Principem metody AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) je selektivní amplifikace fragmentů DNA, které byly získány digescí jedním či dvěma restričními enzymy.

Použitím AFLP je možno vizualizovat sadu restričních fragmentů pomocí PCR bez znalosti jejich nukleotidové sekvence. Polymorfismus je založen na ztrátě nebo získání restričních míst podobně jako u metody RFLP (viz kapitola Restriční analýzy).

Metoda zahrnuje tři základní kroky:

1. Štěpení celkové buněčné DNA jednou nebo dvěma restričními endonukleázami a ligace se specifickými oligonukleotidovými adaptory, které jsou navrženy tak, aby nedocházelo k obnově restričního místa;
2. Selektivní amplifikace sady restričních fragmentů pomocí dvou PCR primerů, které odpovídají adaptoru a specifické sekvenci restričního místa;
3. Elektroforetické rozdělení v nedenurovaném polyakrylamidovém gelu a vizualizace.

AFLP metoda je schopna detekce polymorfismů v různých oblastech genomové DNA současně. Poskytuje vysoké rozlišení a dobrou reprodukovatelnost, výsledkem čehož je její široké použití pro identifikaci genetických variací, v kriminalistice a určování otcovství.

Alu-PCR

Tato metoda patří do skupiny tzv. interrepetitivních PCR, které využívají přítomnosti repetitivních elementů v lidském genomu.

Metoda používá primery, které amplifikují oblast mezi dvěma obráceně orientovanými **Alu-sekvencemi**, které jsou přítomny v množství asi 900 000 kopií v lidském genomu.

Alu-sekvence o délce 300 bp je velmi variabilní a obsahuje sekvenci, která je specifická pro člověka. Pro amplifikaci se připraví dva primery, každý pro jeden směr, přičemž se využije nejvíce konzervativních úseků těchto sekvencí. Primery nelze použít společně, neboť vzájemně hybridizují. Lidské sekvence se amplifikují, pokud leží mezi sousedními Alu-repeticemi, které jsou orientovány v opačných směrech.

Tato technika je často používána pro odlišení lidské DNA od ostatních a k získání specifického fingerprintu pruhů neznámé lidské DNA.

Asymetrická PCR

Asymetrická PCR je modifikace polymerázové řetězové reakce, která umožňuje preferenční syntézu jenom jednoho vlákna z dvojvláknové DNA tím, že jeden z primerů je v nadbytku (asi ve 100x vyšší koncentraci). Dvouřetězové fragmenty DNA se tvoří až do okamžiku, kdy se jeden z primerů vyčerpá. Druhý primer pak dále syntetizuje pouze jeden z řetězců. Vlákna DNA se touto metodou nemnoží exponenciálně, ale téměř lineárně, přes to je množství produktu např. pro sekvenování dostatečné. Asymetrická PCR může být prováděna rovněž pouze s jedním primerem.

Touchdown PCR

Touchdown PCR je další modifikací PCR metody využívající zvýšené nasedací teploty primerů na začátku amplifikace (prvních 3-5 cyklů). V následujících cyklech je tato teplota snižována. V prvních cyklech vzniká určité množství jen specifických produktů a v dalších cyklech je při snížení teploty dosaženo dostatečných výtěžků.

Metoda redukuje nespecifickou hybridizaci primerů na minimum a tím omezuje tvorbu nespecifických produktů.

Multiplex PCR

Mnohonásobná PCR je taková varianta PCR, kdy je do reakční směsi přidáno několik párů primerů rozpoznávajících několik rozdílných cílových sekvencí, což umožňuje amplifikaci a detekci několika PCR produktů současně v jedné reakční směsi. Reakční podmínky (sekvence nukleotidů, koncentrace primerů, optimální teploty jednotlivých kroků cyklu atd.) pro současnou amplifikaci všech produktů je nutné sjednotit. Hlavní výhodou této varianty jsou nižší cenové náklady než při samostatných amplifikacích, a proto se používá pro vyhledávání změn na dlouhých úsecích DNA (např. detekce deletovaných exonů), testování vzájemně nesouvisejících oblastí na DNA a zejména pro amplifikaci vnitřních kontrol současně se vzorky.

Příkladem využití mnohonásobné PCR v naší laboratoři je metoda **MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)** např. pro detekci exonových delecí. Dále Multiplex PCR využíváme při **QFPCR (kvantitativní fluorescenční PCR)** k vyloučení materiální kontaminace vzorku DNA z choriových klků nebo k určení ancestrální alely pomocí STR markerů.

Nested PCR

Nested PCR je vysoce citlivá metoda PCR využívající vnějších a vnitřních primerů, která umožňuje detekovat i jedinou molekulu templátové DNA.

Provádí se ve dvou krocích:

1. Amplifikace templátové DNA zahrnující 15-30 cyklů s jedním párem tzv. **vnějších primerů**.
2. Amplifikace produktu z prvního kroku pomocí páru tzv. **vnitřních primerů**, které jsou specifické pro vnitřní část sekvence amplifikované s párem vnějších primerů. Tento krok zahrnuje dalších 15-30 cyklů a po jeho dokončení se produkt detekuje pomocí elektroforézy. Přenos amplifikačních produktů z první reakce do druhé umožňuje nařazení inhibitorů, které mohly být přítomny v původním vzorku, ale přináší s sebou i možnost kontaminace. Tato oblíbená modifikace polymerázové řetězové reakce má řadu aplikací (např. identifikace DNA v archivních vzorcích s vysokým podílem degradované DNA). Některé aplikace (např. tzv. **semi-nested PCR**) vystačí se sadou pouhých tří primerů.

AS-PCR

Metoda **alelově specifické PCR** je určena pro detekci bodových mutací a malých delecí.

Je prováděna ve dvou paralelních reakcích, kdy v první reakci je jeden primer komplementární k referenční (zdravé) sekvenci a v další reakci k mutantní sekvenci. Druhý primer v obou reakcích je stejný. Předpokládá se, že k elongaci dojde pouze tehdy, pokud jsou primery a cílová sekvence plně komplementární.

V naší laboratoři se používá systém **ARMS (Amplification Refractory Mutation System)** založený na chybějící elongaci v důsledku nedokonalého párování bází na 3'-konci. Metoda je jednoduchá a je-li pečlivě zoptimalizovaná, spolehlivě rozliší heterozygota ve sledovaném lokusu od homozygotů pro jednu nebo druhou alelu. Do ARMS testu musí být zařazena vnitřní PCR kontrola pro jistotu správné amplifikační reakce.

RACE PCR

RACE (Rapid amplification of cDNA ends) neboli takzvaná **rychlá amplifikace 3'- a 5'- konců cDNA** pomocí PCR je metoda, která dovoluje určit počátek a konec transkriptu - mRNA.

Pro použití RACE je nezbytná znalost části sekvence uvnitř molekuly mRNA, ve které je navržen specifický primer orientovaný ve směru 3' nebo 5' umožňující produkci překrývajících se fragmentů cDNA.

3'-RACE využívá přirozeného poly(A)-konce na mRNA.

Nejprve se syntetizuje cDNA reverzní transkripce z mRNA (viz kapitola Reverzní transkripce) a jako primer se použije 17(dT) dlouhý oligomer s navázaným kotevním adaptorem (taktéž 17-mer). Adaptor má vyšší T_m než oligo(dT) a je vhodné, aby nesl restriční místa pro klonování. Při následné PCR amplifikaci se pak použije primer komplementární k adaptoru a druhý, genově specifický primer navržený ze střední známé části cDNA.

5'-RACE pro amplifikaci plnodélkové mRNA využívá tzv. čepičky (CAP – navázaný 7-metylguanosin přes 5', 5'-trifosfát na počátku každé mRNA).

Nejprve se ošetří mRNA tak, aby při pozdějším PCR docházelo pouze k amplifikaci plnodélkové cDNA. mRNA je defosforylována, čímž dochází k odštěpení fosfátové skupiny z 5'-konce všech RNA mimo těch, které jsou chráněny čepičkou a tudíž mají plnou délku. Dále se přidá pyrofosfatáza, která odstraňuje čepičku a zanechává fosfátový zbytek pro následnou ligaci adaptoru. RNA oligo neboli adaptor je cca 35-mer se známou sekvencí pro následnou PCR amplifikaci. Následuje reverzní transkripce, kdy je mRNA přepsána do cDNA. K PCR amplifikaci se použije primer komplementární k adaptoru a druhý, genově specifický primer navržený ze střední známé části cDNA.

Vzhledem k nespecifičnosti adaptoru je vhodné selektovat produkty dalším PCR – nested PCR nebo semi-nested PCR. Adaptor se totiž liguje, resp. v podobě overhangu nasedá na veškerou RNA (všechny cDNA vytvořené metodou reversní transkripce nesou na 5' nebo 3' konci stejnou sekvenci, tudíž je nutné použít primer komplementární k adaptoru v přebytku). Specifičnost reakci dává až druhý primer, který leží uvnitř zkoumaného genu, proto je někdy nutné po prvním PCR udělat ještě druhé PCR.

Restrikční analýzy

Hana Vlášková, Helena Trešlová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Restrikční analýza (**RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism**) je založena na specifickém štěpení DNA restrikčními endonukleázami na fragmenty.

Restrikční endonukleázy štěpí dvouvláknovou DNA ve specifickém místě určeném pořadím nukleotidů v sekvenci DNA. Je známo velké množství bakteriálních restrikčních endonukleáz (asi 1500), které se liší od sebe tím, že rozpoznávají různé krátké sekvence nukleotidů - 4, 6, 8. Obecně restrikční endonukleázy, které rozpoznávají kratší sekvenci, štěpí DNA častěji na menší úseky, zatímco restrikční endonukleázy rozpoznávající delší sekvenci, štěpí méně často a na delší fragmenty.

Rozeznáváme **tři typy restrikčních endonukleáz**.

Enzymy skupiny I. se váží na specifickou rozpoznávací oblast, ale štěpí v nedefinované oblasti mimo tuto rozpoznávací sekvenci.

Podobně se chovají i **enzymy III. skupiny**, které také rozpoznávají specifické sekvence, které však nemusí být vždy symetrické. Ke štěpení pak dochází opět mimo tuto oblast. Proto žádný z těchto dvou skupin enzymů nemá praktické využití.

Nejvhodnější pro klonování jsou **enzymy II. skupiny**, které jsou přísně specifické a rozpoznávají sekvence s rotační symetrií (tzv. **palindromové sekvence**). Jedná se o úseky dvojvláknové DNA, které mají v obou vláknech opačně orientovanou sekvenci.

Označení restrikčních endonukleáz je odvozeno ze zkratk bakteriálního kmene, z něhož byly izolovány a římské číslice.

Jako příklad můžeme uvést nejznámější restrikční endonukleázu **EcoRI** (podle zdroje - bakterie *Escherichia coli*, RI = restriktaza č. 1), která rozpoznává sekvenci 5'-GAATTC-3' a štěpí fosfodiesterovou vazbu v řetězci mezi prvním guanosemem (G) a druhým adenosinem (A).

EcoRI patří do podskupiny restrikčních endonukleáz II. typu, které štěpí obráceně opakované sekvence, takže vznikají fragmenty s tzv. **lepivými konci**. Jiné restrikční endonukleázy II. typu štěpí fosfodiesterové vazby v obou řetězcích na stejném místě, takže místo lepivých konců vznikají tzv. **tupé konce**.

Některé restrikční endonukleázy jsou citlivé na metylaci DNA. V některých případech metylace adeninu a metylace cytosinu inhibují štěpení, v jiných je metylace pro štěpení nezbytná.

Restrikční endonukleázy se dodávají v roztoku s 50% glycerolem, aby při skladovací teplotě (-20°C) enzym nezmrzl. Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením.

Příklady restrikčních endonukleáz a jejich specifických restrikčních míst (označeno tečkou):

MwoI (*Methanobacterium wolfei*),

inkubační teplota = 60 °C:

lepivé konce

5'GCNNNNN.NNGC....3'

3'CGNN.NNNNN....5'

DdeI (*Desulfovibrio desulfuricans*),

inkubační teplota = 37 °C:

lepivé konce

5'.....C.TNAG....3'

3'....GANT.C....5'

HaeIII (Haemophilus aegyptius),
inkubační teplota = 37 °C:
tupé konce

5'....GG.CC....3'
3'....CC.GG....5'

Elektroforéza v agarózovém gelu (horizontální)

Hana Vlášková, Helena Trešlová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Agarózová gelová elektroforéza se používá k detekci produktů amplifikačních nebo restričních reakcí (fragменты DNA) o určité velikosti po PCR nebo PCR-RFLP (viz samostatné kapitoly), k jejich rozdělení a event. preparaci jednotlivých fragmentů pro následnou analýzu (např. sekvenování).

Produkty se dělí podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje.

Sacharido-fosfátová páteř nukleových kyselin je příčinou rovnoměrného rozložení negativních nábojů v molekulách DNA a RNA. Pohyb těchto elektronegativních molekul v elektrickém poli (v mírně alkalickém pufru) ke kladné elektrodě vede k jejich separaci podle molekulové hmotnosti (agaróza tvoří v gelu síť o určité velikosti pórů, větší molekuly DNA putují pomaleji).

V agarózovém gelu lze dělit fragmenty o velikostech 50 bp – 20 000 bp (menší fragmenty se dělí v polyakrylamidovém gelu). Koncentrace agarózy (0,8 - 5,0 %) se volí podle velikosti fragmentů, které mají být separovány (Tabulka 1).

Tabulka 1: Volba koncentrace agarózy

Velikost fragmentů	Koncentrace agarózy
1 - 20 kbp	0,4 - 0,8 %
500 - 1000 bp	2 %
100 - 500 bp	3 %
50 - 100 bp	5 %

Elektroforéza v praxi

Agarózový gel se připravuje vylitím roztoku agarózy do připravené formy s hřebenem, kterým se v gelu vytvoří jamky pro jednotlivé vzorky. Po ochlazení a ztuhnutí agarózy se hřeben vyjme z gelu. Gel se umístí do elektroforetické vany a zalije elektroforetickým pufrům. Vzorky DNA se pak vpraví do jamek v gelu, které jsou již chvíli pod hladinou pufru, nasátím do špičky mikropipety a vytlačení z této špičky do jamky.

Pokud bychom ale takto naložili s prostým vodným roztokem nukleové kyseliny, tak by složky roztoku začaly volně "plavat" v elektroforetickém pufru, který je rovněž vodným roztokem. Prostou difúzí by velká část nukleových kyselin z jamek v gelu "vyplavala" dřív, než bychom naplnili všechny jamky a spustili elektroforézu.

Proto je nutné nukleové kyseliny nejdříve smísit s tzv. nanášecím pufrům, který je těžší než voda, takže v jamce klesne i s nukleovými kyselinami ke dnu a výrazně zpomaluje difúzi. Nejčastěji se používá roztok glycerolu, který obsahuje barvu viditelného spektra, tzv. sledovací barvivo (např. bromfenolová modř, xylencyanol). Jako velikostní standard se používají komerčně dodávané žebříčky nebo DNA z λ -fága štěpená restričním enzymem. Pak je možné uzavřít elektrický okruh připojením ke stabilizovanému zdroji napětí. od té chvíle probíhá elektroforéza a molekuly DNA se pohybují rozdílnou rychlostí podle své velikosti.

Elektroforézu je nutné vypnout v okamžiku, kdy jsou molekuly nukleových kyselin přiměřeně roztríděny. Pokud by elektrické pole působilo příliš dlouho, molekuly by z gelu vycestovaly až ke kladně nabitě elektrodě, kde by došlo k jejich degradaci. Rozdělené fragmenty je možné zviditelnit pomocí fluorescenčních barviv např. ethidiumbromidem interkalací mezi

nukleotidy (50 mg/100 ml gelu) a vizualizovat na transiluminátoru v UV světle s následnou fotodokumentací. Z důvodu kancerogenity ethidiumbromidu a UV-záření je potřeba dodržovat pravidla bezpečné práce.

Chování molekul nukleových kyselin při gelové elektroforéze

Elektroforéza musí probíhat ve vodném roztoku o stálém pH, proto jsou pro přípravu gelu a naplnění elektroforetické vany používány pufry. Jejich úkolem je především neutralizovat ionty H^+ a OH^- , které vznikají hydrolýzou vody na elektrodách.

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (vertikální)

Helena Trešlová, Petr Vyleťal

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) je jednou z nejpoužívanějších metod pro separaci a charakterizaci zejména proteinů, ale i DNA.

Polyakrylamidový gel vzniká radikálovou polymerací směsi akrylamidu (AA) a *N,N'*-metylenbiakrylamidu (BIS), který zajistí jeho zesíťování. Zdrojem volných radikálů je obvykle peroxosíran amonný (APS) a reakce je katalyzována organickou zásadou *N,N,N',N'*-tetrametyletylendiaminem (TEMED).

Elektroforetický systém se obvykle realizuje v planárním uspořádání, kde je velikost a tloušťka gelu vymezena dvěma skleněnými destičkami a dvojicí mezerníků (spacer).

Volba elektrodoových pufrů a pufrů pro přípravu gelů umožňuje širokou škálu aplikací.

PAGE se používá zejména pro analýzu proteinů, ale i DNA. Koncentrace AA/BIS se volí od 3,5 % do 20 % v závislosti na molekulové hmotnosti separovaných molekul, přičemž se využívají jak gely jednokontrační tak gradientové.

V závislosti na chemickém prostředí, ve kterém separace probíhá, lze dále rozlišit nativní a denaturační PAGE. Při **nativní PAGE** dochází k separaci molekul v závislosti na jejich tvaru, nadmolekulární struktuře (proteiny), velikosti a náboji, kdežto při **denaturační PAGE** prakticky pouze na jejich velikosti (molekulové hmotnosti).

Nativní PAGE DNA se s výhodou používá pro analýzu fragmentů kratších než 1000 bp a zejména pro separaci fragmentů po restriční analýze mutací (PCR/RFLP).

Zřejmě nejrozšířenější variantou denaturační PAGE proteinů je elektroforéza v přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného (**SDS-PAGE**), popř. i redukčního činidla, které způsobí disociaci disulfidových vazeb (dithiotreitol nebo častěji merkaptoetanol). SDS se váže na všechny proteiny v určitém poměru, čímž do značné míry unifikuje jejich náboj a konformaci, takže jejich migrace závisí, vedle porozity gelu a velikosti vloženého napětí, pouze na molekulové hmotnosti. Velmi často je PAGE realizována diskontinuálně. Vzorky se nanášejí na vrstvu tzv. **zaostřovacího gelu (stacking gel)**, ve kterém dochází po aplikaci elektrického napětí k jejich fokuzaci do úzkých zón a po přestupu do tzv. **separačního gelu (separating nebo running gel)** k vlastní separaci, která trvá několik hodin. Oba gely se liší koncentrací PA/BIS, iontovou silou a někdy také pH.

SDS-PAGE se využívá zejména pro separaci komplexních proteinových směsí (buněčné a tkáňové lyzáty, biologické tekutiny), studium podjednotkové struktury, postranlačních modifikací (glykosylace), ověření homogenity proteinových preparátů a v celé řadě dalších aplikací.

Separované proteiny lze detegovat v gelu různými **barvicími metodami** (Coomassie blue, stříbro, fluorescenčně SyproRuby) nebo až po jejich elektropřenosu na nylonovou nebo polyvinylidenfluoridovou (PVDF) membránu (**Western blot**). Na membráně lze proteiny opět detegovat **barvením** (Comassie blue, tuš) nebo specificky pomocí protilátek proti danému proteinu (**immunoblotting**).

Speciální formou vertikální elektroforézy, která je velmi využívaná v naší laboratoři, je **sekvenování na planárním fluorescenčním sekvenátoru AlfExpress** (viz kapitola Sekvenování nukleových kyselin), kde složení polyakrylamidového gelu umožňuje separaci řetězců lišících se pouze o jeden nukleotid.

Sekvenování nukleových kyselin

Helena Trešlová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Pro zjišťování pořadí nukleotidů v daném úseku DNA existují dva odlišné principy sekvenačních metod (za oba byla udělena Nobelova cena).

Tzv. „dideoxy“ metoda (Sangerova) je enzymová metoda, jejíž využití v současné době zcela zastínilo druhou, chemickou metodu (Maxam-Gilbertova metoda).

Sangerova enzymatická metoda využívá DNA polymeru pro vytvoření komplementární kopie jednořetězcového templátu a je založena na schopnosti DNA-polymerázy používat jak 2'- deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP) tak i 2', 3'- dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP) jako substráty. Je-li takováto modifikovaná báze ddNTP inkorporována do rostoucího řetězce, dojde k zastavení jeho syntézy, neboť takový řetězec postrádá terminální 3'-hydroxylovou skupinu.

Dideoxy metoda dále využívá skutečnost, že DNA polymeráza nemůže iniciovat polymeraci bez přítomnosti primeru (krátká molekula nukleové kyseliny, asi 20 párů bazí), z jehož 3'-konce pokračuje elongace (syntéza komplementárního řetězce DNA). Primer po připojení ke komplementární části templátu vymezuje úsek, který bude sekvenován.

Deoxynukleotidy jsou připojovány na základě komplementarity k templátu a řetězec je prodlužován tvorbou fosfodiesterové vazby mezi 3'-hydroxylovou skupinou a 5'-fosfátovou skupinou nově připojovaného deoxynukleotidu až do doby, kdy je do řetězce náhodně inkorporován místo deoxynukleotidu dideoxynukleotid.

Tato metoda využívá stejného principu jako polymerázová řetězová reakce (viz kapitola PCR), kdy je templátová DNA množena pomocí primerů a polymerázy v cyklické reakci. V případě sekvenační reakce se ovšem použije pouze jeden primer a tudíž dochází k syntéze jen jednoho řetězce v jednom směru.

V současné době se v naší laboratoři pro sekvenování DNA používají 2 typy přístrojů (planární fluorescenční sekvenátor AlfExpress a kapilární sekvenátor ABI PRISM 3100-Avant). Oba přístroje využívají princip Sangerovy enzymatické dideoxy metody a fragmenty DNA jsou v obou děleny gelovou elektroforézou (polyakrylamidovou vertikální či kapilární). Jak bude vysvětleno později, hlavní rozdíly mezi přístroji jsou ve způsobu využití fluorescenčních značek (AlfExpress využívá jednu fluorescenční barvou značený primer, zatímco 3100-Avant dokáže odlišit více fluorescenčních barev a má značené ddNTP).

Přístroj AlfExpress vyžaduje 4 samostatné sekvenační reakce a samostatné dělení při elektroforéze pro každý jednotlivý nukleotid (A, C, G, T) z důvodu možné detekce pouze jedné fluorescenční barvy, kterou je označen primer. Aby byly vytvořeny čtyři sekvenační směsi ukončené specificky vždy v pozici jediného nukleotidu, je do každé ze čtyř mikrokumavek přidán vždy pouze jeden typ ddNTP. Poměr ddNTP a směsi všech čtyř dNTP je volen tak, aby jednotlivé podíly elongačních produktů byly ukončeny se stejnou pravděpodobností. Tímto způsobem vznikají v každé elongační směsi řetězce se stejným 5'- koncem, definovaným použitým universálním fluorescenčně značeným primerem a s variabilním 3'- koncem, zakončeným specifickým dideoxynukleotidem.

Po zastavení sekvenační reakce jsou dvojřetězcové molekuly DNA denaturovány teplem tak, aby došlo k oddělení templátu od značených vláken ukončených jednotlivými dideoxynukleotidy. Tyto fragmenty jsou pak elektroforeticky za denaturačních podmínek

rozděleny na polyakrylamidovém gelu. Nevýhodou tohoto typu sekvenátoru je skutečnost, že na každé sekvenování je nutno připravit vždy novou reakci, dále pak nižší kapacita stroje (pouze 10 vzorků na jeden sekvenační běh trvajícím cca 12 hodin) a též samotná příprava polyakrylamidového gelu.

Sekvenování na **kapilárním sekvenátoru 3100-Avant** má oproti sekvenování na přístroji AlfExpress výhodu v tom, že sekvenační reakce probíhá pro všechny 4 nukleotidy v jedné mikrozkušavce (v komerčním kitu BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit od firmy Applied Biosystems jsou různými fluorescenčními barvami označeny všechny 4 dideoxynukleotidy), a tak mohou být během jednoho běhu děleny všechny 4 nukleotidy najednou. Další výhodou je potřeba menšího množství templátu DNA. Odpadá zde též nutnost náročného nalévání gelu a nanášení vzorků na gel (kapilára se plní polymerem automaticky).

Nejdříve je nutné připravit sekvenační reakce obsahující templát DNA, primer, kit s fluorescenčně značenými ddNTP, speciální sekvenační pufr a vodu, celkový objem sekvenační reakce je 20 ul. Takto připravený vzorek, který je napipetovaný v mikrotitrační destičce s kapacitou 96 jamek (1 jamka = 1 vzorek) se vloží do termocykleru, kde proběhne cyklická reakce (střídání několika cyklů denaturace, nasedání primerů a prodlužování vláken), během níž dojde k amplifikaci templátu. Do reakce se dává pouze jeden primer, amplifikace je tedy lineární. Výsledkem je směs různě dlouhých fragmentů zakončených specifickým terminátorem.

Po připravení sekvenační reakce je nutné ze směsi oddělit nevyužité tzv. BigDye terminátory (fluorescenčně značené volné ddNTP), které by později rušily detekci výsledné sekvence (příliš zvyšují pozadí). Přečištění lze dělat různými metodami, nám se osvědčila metoda etanolové precipitace, kdy se v prvním kroku DNA vysráží pomocí acetátu sodného a 96% etanolu a potom se odsolí a promyje 70% etanolem. Nakonec už je potřeba jen vzorek rozpustit ve formamidu (highly deionized Hi-Di Formamid) a celou destičku se vzorky vložit do sekvenátoru.

Pro sekvenaci nejčastěji používáme 50 cm kapiláru, kde je vzorek nesen polymerem POP-6. Optimálně získáváme sekvenci dlouhou 600-800 bazí. Kapilární elektroforéza probíhá v prostředí pufru s EDTA.

Kapilára a kladná elektroda vstupují do jamky se vzorkem (Obr. 6), vloží se napětí a záporně nabitě fragmenty DNA vstupují do kapiláry a postupují směrem k anodě, která je na druhém konci kapiláry. Fragmenty DNA nesoucí jednu ze čtyř fluorescenčních značek jsou ozářeny argonovým laserovým světlem, dochází k excitaci a emitované světlo je snímáno tzv. CCD kamerou (4 vlnové délky jsou snímány současně). Software vyhodnocuje emisní obrazce a převádí je do podoby barevných křivek.

V naší laboratoři máme v současné době v dispozici 4-kapilární stroj, tzn., že jsme schopni během jednoho běhu současně sekvenovat 4 vzorky. Délka jednoho běhu je asi 2,5 hodiny, tzn. celou destičku s 96 vzorky jsme schopni osekvenovat za 2,5 dne. Velkou výhodou je skutečnost, že vzorky lze opakovaně sekvenovat, degradace vzorku ve formamidu nastává až po přibližně jednom týdnu.

V současné době využíváme sekvenování nejčastěji pro diagnostické účely, a to hlavně pro identifikaci neznámých mutací přímým sekvenováním PCR produktů nebo klonů při nezbytnosti oddělení alel.

Fragmentační analýza na přístroji ABI PRISM 3100-Avant

Přístroj 3100-Avant lze použít i pro fragmentační analýzu, při které jsou jednotlivé fragmenty DNA, tzv. mikrosatelity, rozděleny podle své délky. Jako mikrosatelity se označují repetitivní DNA sekvence, které jsou nejčastěji tvořeny opakováním mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidů, např. $(A)_n$, $(AT)_n$, $(ATA)_n$ apod. Počet opakování jednotky (repetice) v konkrétním místě DNA (lokusu) definuje alelu.

Fragmenty DNA připravíme PCR reakcí s jedním nebo několika páry primerů, kdy jeden primer z každého páru je fluorescenčně značený. V průběhu jediného běhu pak můžeme současně analyzovat několik různých fragmentů za předpokladu, že se navzájem liší svou délkou nebo jsou označeny různými fluorescenčními barvami. Spolu s každým vzorkem běží interní délkový standard (DS-30: 6FAMTM, HEX, NEDTM, ROXTM) nebo (DS-33: 6FAMTM, VIC®, NEDTM PET®, LIZ®), který umožní přesnou identifikaci jednotlivých fragmentů. Je možné využít až pěti různých fluorescenčních značek, přičemž pátá je pak vyhrazena pro délkový standard. Fragmenty jsou analyzovány v 36 cm kapiláře a polymeru POP-4.

V současné době využíváme fragmentační analýzu nejčastěji pro diagnostické účely, např. pro zjištění materiální kontaminace tkáně plodu při prenatální diagnostice v postižených rodinách nebo pro metodu identifikace velkých delecí – Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Menší využití je dále pro výzkumné účely, např. pro metodu stanovení zešíkmení inaktivace chromosomu X. Toto vyšetření je založeno na rozdílné metylaci promotorových sekvencí genů na aktivním a neaktivním chromosomu X.

Technologie DNA čipů

Hana Hartmannová, Lenka Nosková

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Metodika **DNA čipů (DNA microarrays)** je založena na simultánní detekci velkého množství genových transkriptů. Je založena na imobilizaci prob odpovídajících většinou určitým genům a hybridizaci komplementárních řetězců ve vyšetřovaném vzorku. Výhodou metody je získání velkého množství dat z jednoho vzorku, u celogenomových čipů získání dat o celkovém genetickém profilu daného vzorku.

Existuje několik **druhů DNA čipů**: u **expresních** se měří relativní poměr exprese genů vzorku a kontroly, u **genotypovacích** lze stanovit jednonukleotidové polymorfismy, při **komparativní genomové hybridizaci (CGH)** je možné detekovat velké genomové inserce nebo delece.

V naší laboratoři se používají především expresní čipy, u kterých se měří relativní poměr exprese genů vzorku a kontroly.

Pro přípravu DNA čipů bylo ve spolupráci s GeneAge Technologies navrženo, vyrobeno a testováno robotické nanášecí zařízení - **GeneSurfer**. Tento unikátní přístroj a jeho vlastní softwarové ovládání umožňuje připravovat v jednom cyklu až 60 čipů (podložních mikroskopických skel) o maximální hustotě 4900 prob/cm² (až 80 000 elementů na efektivní plochu).

Prvním krokem při výrobě DNA čipů je výběr genů, které na něm budou zastoupeny. Ke každému genu je pak navržen specifický 40 bazí dlouhý oligonukleotid pomocí softwaru Oligopicker (<http://pga.mgh.harvard.edu/oligopicker>). Případná hybridizace jednotlivých oligonukleotidů k homologním genům je vyloučena v programu BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Oligonukleotidy jsou poté komerčně nasyntetizovány. Pro přípravu microarray se oligonukleotidy rozpouštějí v 3x SSC na koncentraci 20μM a pipetují se pomocí robotického přístroje Biomek do 384-jamkových destiček. Veškeré informace o oligonukleotidu, jeho sekvence, koncentrace a umístění v jednotlivých destičkách jsou uloženy v lokálně instalované databázi BASE (<http://base.img.cas.cz>).

DNA čipy se tisknou na podložní skla, která jsou modifikována buď aminosilanem nebo poly-L-lysinem. Tisk je navržen tak, aby byla vytvořena pravidelná mřížka spotů umožňující jejich identifikaci.

Po natištění jsou oligonukleotidy na čipu imobilizovány kombinací zapečení při 80°C a UV záření. Kvalita jednotlivých sérií tisku je kontrolována pomocí hybridizace fluorescenčně značených panomerů (random 9-merů) a následným skenováním. Microarrays lze uchovávat při pokojové teplotě v bezprašném prostředí.

Značení vzorků na DNA čipy a hybridizace

Pro přípravu vzorků na hybridizace je vždy nutné použít RNA velmi dobré kvality.

V naší laboratoři je standardně používán systém Genisphere Expression Array Detection Kit (http://www.genisphere.com/array_detection_protocols.html). Na jednom čipu se vždy porovnávají dva vzorky (např. pacient a kontrola), každý vzorek je značen jinou fluorescenční značkou (Cy3 a Cy5). Prvním krokem je reverzní transkripce, k ní je využíván oligo dT primer, který se váže jen na polyA konec mRNA. Tento primer ještě obsahuje specifický

overhang, který se využívá pro vazbu fluorescenční značky – 3DNA Capture Reagent (Obr. 3).

Standardní množství RNA potřebné pro hybridizaci jednoho vzorku je 5 μ g RNA, v případě nedostatečného množství RNA je možné před reverzní transkripci zařadit ještě krok RNA amplifikace. Po reverzní transkripci se původní RNA degraduje a vzniklá cDNA se hybridizuje 16 hodin v hybridizačním pufru při 65°C ve vodní lázni v hybridizačních komůrkách. Následuje odmytí nenavázaných cDNA v pufrch o snižující se koncentraci solí a druhá hybridizace. Při ní se hybridizuje fluorescenční značka 3DNA Capture Reagent, která se specificky naváže na overhangy cDNA navázaných na čip. Zbytek nenavázané značky se znovu odmyje a výsledný signál se detekuje v skeneru Axon Instruments. Pro následnou analýzu obrazu se využívá software Genepix Pro 6.1. Analýza spočívá v přiložení mřížky na získaný obraz, v identifikaci jednotlivých spotů a výpočtu intenzity jejich signálů. Následuje složitá bioinformatická analýza získaných dat za použití statistických programů.

Molekulární klonování

Lenka Mrázová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Molekulární klonování se používá k získání velkého počtu identických kopií biologického materiálu. Klonování je možné **in vitro** – např. PCR (viz kapitola PCR), s počtem chyb cca $10^3 - 10^4$ bazí, nebo **in vivo**, např. pomocí bakterií, kde je počet chyb o několik řádů nižší.

Při klonování se využívá schopnosti bakterií nést a replikovat kromě vlastní chromozomální DNA i malé kruhové molekuly DNA, několik tisíc bazí dlouhé – tzv. **plazmidy**. Tyto plazmidy nejsou nezbytné pro základní potřeby bakterií, tedy růst a rozmnožování, ale nesou v sobě vlastnost, která daný organismus zvýhodňuje v určitém prostředí, např. rezistenci k antibiotikům. K diagnostickým účelům klonujeme úseky genomové nebo kódující DNA několik stovek až tisíc bazí dlouhé.

Princip klonování

Zkoumanou část DNA nejprve namnožíme *in vitro* např. pomocí PCR, tuto cizorodou DNA vložíme do technicky upraveného plazmidu – tzv. vektoru, a ten pak transformuje do bakterie.

Vlastnosti vektoru

Vektor obsahuje informace pro replikaci, dále selekční vlastnost, zpravidla rezistenci k určitému antibiotiku či antibiotikům, např. ampicilinu, kanamycinu, neomycinu apod., a také technicky připravený úsek DNA, tzv. polylinker, do kterého lze ligací vložit cizorodou DNA. V polylinkru se nachází obvykle několik různých restričních míst, které se jinde ve vektoru nenacházejí. Dále může vektor podle potřeby dalšího výzkumu nést promotorový úsek a polyA úsek, které zajistí transkripci cizorodé DNA, např. při zkoumání aktivity proteinů a jejich mutantních forem.

Vlastnosti bakterií

Nejčastěji se používají technicky upravené nepatogenní bakterie rodu *Escherichia coli*. Pomocí CaCl_2 dochází k narušení buněčné stěny bakterií, která se stává prostupnou, a tak jsou *E. coli* schopné přijmout vektor i s cizorodou DNA.

Vložení cizorodé DNA do vektoru

Kruhový vektor se nejprve linearizuje štěpením v místě polylinkeru restričními endonukleázami (viz kapitola Restriční analýzy). Ty vytvářejí buď ostré, nebo tupé konce. Stejně je upravena i cizorodá DNA vytvořením komplementárních konců. Vektor s cizorodou DNA je poté spojen ligací, čímž vznikne opět kruhový tvar.

Některé firmy dodávají vektory již linearizované, které využívají tzv. **TA klonování**. TA klonování je založeno na vlastnosti některých polymeráz při PCR amplifikaci přidávat adeninový zbytek na konec vytvářeného řetězce. Komerční linearizovaný vektor nese přesahující thyminový zbytek. Samotná ligace je pak velice rychlá (5-15 minut) a je vysoce účinná.

Vnesení vektoru do buněk – transformace

Plazmid, vytvořený spojením vektoru s cizorodou DNA, se vnese do živých buněk pomocí šoku, který je buňkám uměle navozen. Při něm dojde ke krátkodobému roztažení pórů v cytoplazmatické membráně, kterými vnikne plazmid dovnitř. Šok se provádí buď rychlou změnou teploty – heat shock, nebo elektrickým impulzem – elektroporace. Ihned poté se k buňkám přidá živné médium, ve kterém se asi jednu hodinu nechají růst. Během této

doby dojde k „rekonvalescenci“ buněk, jejich narušená buněčná stěna se obnoví a buňky se začnou dělit. Směs se pak přenesse na Petriho misku s živným agarem, ve kterém je obsaženo selektivní činidlo, zpravidla antibiotikum. Misky s rovnoměrně nanesenými buňkami necháme růst do druhého dne v inkubátoru při 37°C. Díky selektivnímu tlaku mohou růst pouze buňky ve kterých je plazmid přítomen, neboť on nese rezistenci k antibiotiku přidaného do média. Buňka bez plazmidu tuto rezistenci nemá a zahyne. Druhý den je miska poseta několika až stovkami koloniemi buněk, každá vznikla dělením jedné jediné buňky nesoucí původně jeden plazmid.

Klonování v diagnostice

Rozdělení alel se provádí v případech, kdy potřebujeme zjistit polohu mutací cis nebo trans u pacientů, od kterých není dostupný materiál rodičů, nebo v případech, kdy dochází k inserci nebo deleci několika bazí na jedné z alel (sekvence přímého sekvenování je v tomto případě nepřehledná).

Využíváme zde vlastnost - jeden plazmid = jedno vlákno DNA (jedna alela) = jeden klon. Polohu mutací cis nebo trans je možné určit jen v případě, jsou-li mutace od sebe vzdáleny jen několik desítek až stovek bazí. Při velké vzdálenosti dochází během PCR k „přeskakování“ polymerázy a výsledky jsou nepřesné.

Časový plán pro TA klonování:

1. den:

PCR reakce	2 – 3 hodiny
Přímá izolace PCR produktu	½ hodiny
„Áčkování“ je reakce, při níž dojde k navázání dATP na konec PCR produktu (lze vynechat, záleží na typu polymerázy)	15 min
Legace	5 – 15 min
Transformace	2 – 3 hodiny
Nanesení buněk na Petriho misky	15 min

2. den

Přenesení jednotlivých kolonií do tekutého média	1 hodina (pro 30 kolonií)
--	---------------------------

3. den

Izolace plazmidů (30 plazmidů)	1 a ½ hodiny
Sekvenování	3 – 4 hodiny

**Vybrané vyšetřovací metody
v cytogenetice**

Cytogenetika, karyotyp, chromozomální aberace

Drahuše Novotná, Daniel Chudoba,

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Cytogenetika studuje změny počtu a struktury chromozomů – tzv. **chromozomální aberace**. Tyto aberace v sobě obsahují většinou rozsáhlé genové soubory, které jsou v případě aberace buď zmnoženy nebo redukovány, což se u pacientů projevuje mnohočetným postižením různých orgánových soustav. Nejedná se tedy o izolované vady, ale o nemoci charakteru syndromů. K obvyklým projevům chromozomálních aberací patří:

- mentální nebo psychomotorická retardace;
- poruchy vývoje centrální nervové soustavy;
- skeletální anomálie, růstová retardace;
- deformity končetin a prstů včetně výskytu nadpočetných prstů;
- poruchy reprodukce nebo úplná sterilita;
- poruchy vývoje genitálu;
- vrozené srdeční vady;
- anomálie ledvin, trávicího traktu a dalších orgánů;
- abnormální obličejové rysy – např. šikmé postavení očí, mikroftalmie, hypertelorismus, rozštěp rtu, popř. patra, gotické patro, vznik mikromandibuly, abnormální tvar a posazení ušních boltců;
- poruchy reprodukce nebo úplná sterilita;
- poruchy nitroděložního vývoje plodu, spontánní potraty;
- poruchy imunity;
- zhoršení prognózy a extrémní zkrácení délky života;
- dispozice k některým nádorovým onemocněním;
- nekontrolované buněčné dělení – kancerogeneze.

Chromozomy vyšetřujeme obvykle ve 2. fázi mitotického dělení – metafázi, kdy jsou následkem spiralizace zkráceny a kondenzovány tak, že je můžeme pozorovat v optickém mikroskopu. Chromozom je v této etapě buněčného cyklu zdvojený, tj. tvořený dvěma nukleoproteinovými vlákny – chromatidami. Jsou spojeny v místě primární konstriktce, kde se nachází centromera – struktura, která se připojuje k dělicímu vřeténku a umožňuje správný rozchod chromozomů do dceřiných buněk. Primární konstriktci jsou chromozomy rozděleny na krátká raménka, označovaná „p“, a dlouhá raménka, označovaná „q“. Konce ramének se nazývají telomery a mají velký význam pro stabilizaci struktury chromozomu. V průběhu stárnutí buňky se zkracují, až konečně jejich ztráta navodí degradaci chromozomu a následně vede k zániku buňky.

Karyotyp zdravého člověka je tvořen 46 chromozomy, 22 páry autozomů a pohlavními chromozomy (gonozomy) XX u ženy a XY u muže. Podle vzájemného poměru délky p a q ramének rozlišujeme v lidském karyotypu chromozomy metacentrické, submetacentrické a akrocentrické. Podle tvaru a velikosti je rozdělujeme do 7 skupin:

A chromozomy velké, metacentrické 1-3

B velké, submetacentrické chromozomy 4 a 5

C střední submetacentrické chromozomy 6-12 a X

D menší akrocentrické chromozomy 13-15

E menší meta- až submetacentrické chromozomy 16-18

F malé metacentrické chromozomy 19 a 20

G malé akrocentrické chromozomy 21 a 22, k nimž se pro podobný vzhled řadí také Y.

Při vývoji zárodečných buněk dochází k redukci diploidní sady 46 chromozomů na polovinu, čili na haploidní sadu. Zdravé vajíčko má karyotyp 23,X, normální spermie 23,X nebo 23,Y. Na rozdílné velikosti a tedy i hmotnosti chromozomů X a Y jsou založeny některé metody separace spermií za účelem volby pohlaví dítěte.

Chromosomální aberace dělíme na početní (numerické) a strukturální.

Numerické aberace jsou odchylky od normálního diploidního počtu, tj. 46,XX nebo 46,XY. Jedná-li se o znásobení celé chromozomové sady, hovoříme o **polyploidii**.

V lidské cytogenetice se můžeme setkat s triploidii ($3 \times 23 = 69$ chromozomů), vzácněji tetraploidii (96 chromozomů), a to téměř výlučně při vyšetřování spontánně potracených plodů. K triploidii dochází v případech oplození vajíčka dvěma spermii (dispermie) nebo splynutím diploidní a haploidní gamety. Někdy se z polyploidní zygoty embryo vůbec nevyvíjí a placenta se změní v neorganizovanou buněčnou masu, tzv. parciální molu.

Početní odchylky chromozomů od násobku základního počtu neboli odchylky od euploidie označujeme jako **aneuploidní**.

Nejčastějšími aneuploidii somatických buněk jsou **trizomie**, tj. přítomnost některého chromozomu ve třech kopiích na buňku.

V humánní genetice jsou známy trizomie chromozomu 21 (**Downův syndrom**), chromozomu 18 (**Edwardsův syndrom**) a chromozomu 13 (**Patauův syndrom**). Ostatní autozomální trizomie způsobují obvykle odumření embrya in utero. Vzácnými výjimkami jsou mozaiky (směsné konstituce více buněčných klonů v organismu; klonem je nazývána linie buněk se stejným karyotypem), kdy trizomii nacházíme jen v některém buněčném klonu anebo v některé tkáni jedince.

Nadpočetné chromosomy X vedou u žen k vývoji tzv. **superfemale** (karyotyp 47,XXX), u mužů ke **Klinefelterovu syndromu** (47,XXY). Muž s nadpočetným chromozomem Y (47,XYY) je označován jako **supermale**.

Chybění chromozomu, **monozomie**, je vesměs s životem neslučitelné; výjimkou je monozomie X, která je nejčastější příčinou **Turnerova syndromu**.

Příčinami početních aberací chromozomů jsou obvykle poruchy meiotického dělení při vývoji gamet, a sice chybný rozchod chromozomů vedoucí ke vzniku dizomických ($n = 24$) nebo nulizomických ($n = 22$) gamet. Po splynutí s normální gametou vzniká trizomická či monozomická zygota. Vzácněji dochází k nesprávnému mitotickému dělení v raných fázích vývoje embrya, což vede buď k aneuploidii všech buněk či vzniku mozaiky. Při rýhování vajíčka může dojít i k opačnému jevu, kdy chyby v rozchodu chromozomů původně trizomické zygoty vedou k dizomii a nadbytečný chromozom je eliminován úplně anebo do buněk, z nichž se vyvíjejí zárodečné obaly. V případech, kdy zbylé dva chromozomy pocházejí od stejného rodiče, se může projevit efekt uniparentální dizomie, známý např. u syndromů Prader-Williho a Angelmanova. Situace, kdy je aneuploidní linie koncentrována do extraembryonální tkáně, vede k falešně pozitivní prenatální diagnostice z choriových klků.

Změny stavby chromozomů označujeme jako **strukturální aberace**.

Podle charakteru je lze rozdělit na delece, duplikace, translokace, inverze, kruhové chromozomy, izochromozomy a marker chromozomy.

Delece jsou ztráty chromozomálních úseků, a to buď koncových (terminální delece) nebo vnitřních (intersticiální delece). Příkladem je terminální delece krátkých ramen 5. chromozomu, projevující se fenotypicky jako syndrom kočičího křiku, nebo intersticiální delece části dlouhých ramen 22. chromozomu s fenotypem DiGeorgeova syndromu.

Duplikace je zdvojení části chromozomu, např. zdvojení terminální části krátkých ramen 11. chromozomu, projevující se jako syndrom Beckwith-Wiedemannův.

Translokace je přesun či výměna genetického materiálu různých chromozomů. Dělíme je na robertsonské a reciproké. **Robertsonské** translokace vznikají ztrátou krátkých ramen a splnutím centromerických oblastí akrocentrických chromozomů. Jako **reciproké** označujeme vzájemné výměny materiálu 2 či více různých chromozomů. Při účasti 3 a více chromozomů hovoříme o komplexních přestavbách.

Podle toho, zda je či není zachováno normální množství genetického materiálu, rozlišujeme **translokace balancované** (vyvážené) a **nebalancované** (nevyvážené). Nosiči balancovaných translokací mají většinou normální fenotyp, ale trpí poruchami plodnosti nebo narozením postižených dětí. Příkladem mohou být nosiči relativně časté robertsonské translokace (14;21), s normálním fenotypem, ale postižení opakovanými aborty a potomky s Downovým syndromem. Tyto děti mají tzv. translokační formu trisomie 21, kdy dva chromozomy č. 21 jsou volné a třetí je vázán na chromosomu 14. Postižení potomků nosičů reciprokých translokací je způsobeno částečnými duplikacemi a delecemi a tomu odpovídajícím fenotypem – obvykle faciální stigmatizací, orgánovými vadami a opožděním psychomotorického vývoje.

Vzácně mohou být i zdánlivě balancované translokace zdrojem postižení jedince, a to v situacích, kdy zlomem a znovuspojením je buď poškozen stávající gen nebo aktivován gen dosud mlčící (časté u onkogenů, viz dále).

Inverze je otočení chromozomálního segmentu o 180°. Rozlišujeme inverze **pericentrické**, kdy invertovaný úsek zahrnuje centromeru, a **paracentrické**, u nichž leží převrácený úsek mimo centromerickou oblast. Samy o sobě mají charakter balancovaných aberací, ale při gametogenezi mohou díky crossing-overu způsobovat vznik duplikací a delecí chromozomálních částí s následkem postižení potomstva. Je známo několik tzv. benigních inverzí, které se dědí v rodinách beze změn a bez negativních fenotypových projevů. Jsou to malé pericentrické inverze chromozomů 2, 3, 10 a především častá inverze chromozomu 9, která obsahuje pouze heterochromatinové oblasti chromozomu 9.

Kruhové chromozomy (rings) vznikají odlomením částí chromozomů a následným spojením volných konců a mají tedy charakter delecí.

Izochromozomy vznikají příčným rozdělením mitotických či meiotických chromozomů. Do dceřiných buněk takto putují zdvojená krátká či dlouhá raménka chromozomu. Příkladem je izochromozom dlouhých ramen chromozomu X, vedoucí k projevům Turnerova syndromu.

Marker chromozomy jsou malé, často nadpočetné chromozomy, pocházející z fragmentů chromozomů se zachovanou centromerou. Pokud neobsahují euchromatin, vyskytují se obvykle familiárně. Někdy je marker chromozomem pocházejícím z chromozomu X nebo Y nahrazen chybějící gonozom.

Strukturální aberace vznikají obvykle jako následky zlomů a nesprávného znovuspojení poškozených chromozomů. Dojde-li k takovéto situaci v zárodečné buňce a ta se pak úspěšně zúčastní procesu oplození, narodí se – pokud se nejedná o letální aberaci – postižený jedinec nebo nosič balancované přestavby. Aberace v somatické buňce může způsobit její zánik nebo naopak vede k nekontrolované proliferaci, ke kancerogenezi.

Tkáně pro cytogenetické vyšetření

Drahuše Novotná, Daniel Chudoba

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Chromozomální (neboli **cytogenetické** – nikoli cytologické!) **vyšetření** lze provádět prenatalně i postnatalně; v současnosti je specifikem též vyšetření preimplantační.

Nejpoužívanějším základem **prenatálního vyšetření** jsou **buňky plodové vody** získané amniocentézou, jednak proto, že se jedná o nejšetrnější způsob odběru prenatalní tkáně, jednak pro snadnou kultivaci amniocytů in vitro. Ovšem vzhledem k malému množství živých buněk v plodové vodě trvá namnožení buněk pro potřeby cytogenetického vyšetření přibližně dva týdny. Dále je možno nakultivovat a vyšetřit **buňky choria a placenty, pupečnickovou krev a** ve speciálně indikovaných případech i **jiné tkáně plodu**, odebrané biopsií pod přímou ultrazvukovou nebo fetoskopickou kontrolou.

Postnatalně, eventuálně **postmortálně** lze v tkáňové kultuře namnožit **různé typy buněk** – kůže, svaly, gonády, kostní dřeň, solidních nádorů, výpotků atd.), ale nejčastěji se využívá vyšetření **lymfocytů** získaných odběrem žilní krve.

K odběru se používají stříkačky ošetřené litium-heparinem; tato látka zabraňuje srážení krve a v nízké koncentraci nezhoršuje kultivaci jako EDTA, jež se používá ve stříkačkách určených pro odběry krve na izolaci DNA. Všechny typy odběrů na chromozomální vyšetření je nutno provádět do jednorázových plastových materiálů za přísně sterilních podmínek, před odběrem desinfikujeme místo vpichu alkoholem.

Kultivace lymfocytů, vzhledem k jejich vysoké koncentraci v lidské krvi, je krátkodobá, trvá podle charakteru následného vyšetření 48-72 hodin.

K získání metafázických chromozomů se používá kolcemid, derivát mitotického jedu kolchicinu, jenž rozrušuje vlákna dělicího vřeténka a tím zabraňuje dalšímu postupu buněčného cyklu.

Buněčná kultivace a působení kolcemidu jsou ukončeny centrifugací buněk a odsátím kultivačního média ve formě supernatantu. Chromozomy jsou uzavřeny v buňkách a k jejich izolaci se používá hypotonických roztoků, které způsobí nafouknutí buněk, ztenčení buněčné membrány a rozvolnění chromozomů. Nejobvyklejšími hypotonickými roztoky jsou 0,075 M roztok chloridu draselného pro periferní a pupečnickovou krev a destilovanou vodou naředěné tkáňové medium pro dlouhodobé kultury.

Hypotonický roztok je nejúčinnější při teplotě 37° C, jeho působení na buňky je opět ukončeno centrifugací a výměnou za roztok fixační, složený ze tří dílů metanolu a jednoho dílu ledové kyseliny octové. Fixace je několikrát zopakována, až supernatant získá vzhled čiré tekutiny. Výsledná suspenze je nakapána na mikroskopická podložní skla. Zbytek fixace se přitom odpaří a uvolněné chromozomy adherují na povrch skla. Aby se chromozomy nekonzentrovaly do nevhodných shluků, ale naopak se pěkně rozprostřely po preparátu, používají se skla předem namočená do studené vody anebo, častěji, namražená na suchém ledu (tuhý CO₂) nebo v mrazničce.

Zpracování buněčné kultury od okamžiku přidání kolcemidu až do nakapání a dehydratace skel trvá zhruba jednu pracovní směnu. Výsledný vzhled preparátů závisí do značné míry na zručnosti a zkušenosti laboratorního personálu. Nicméně i tak zde působí řada dalších vlivů: různé vzorky kultivované a zpracovávané týmiž pracovníky za stejných podmínek se ve výsledku více či méně odlišují.

Vzhledem k tomu, že se jedná o práci s biologickým materiálem za použití chemikálií, někdy jedovatých, plynových kahanů a elektrických spotřebičů, je třeba dodržovat pravidla bezpečnosti práce a ochrany zdraví.

Vizualizace chromosomů

Drahuše Novotná, Daniel Chudoba

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Nejjednodušší metodou vizualizace je tzv. **klasické barvení roztokem podle Giemsy-Romanowského**. Všechny chromozomy jsou pak homogenně tmavé, rozlišíme jejich počet a velmi hrubou stavbu.

Metoda se obvykle používá k hodnocení chromozomálních zlomů a nestabilních přestaveb u osob vystavených profesně či terapeuticky působení klastogenních činitelů (viry, chemické látky včetně cytostatik, záření) anebo u pacientů s poruchami reparace poškozené DNA (tzv. syndromy chromozomální instability, např. Fanconiho anémie, ataxia-teleangiectasia, Nijmegen-breakage syndrom). V těchto případech nezáleží na přesném určení chromozomální přestavby, ale na podílu buněk s aberacemi ve srovnání se zdravými, resp. neexponovanými jedinci. Výsledkem cytogenetického vyšetření není stanovena diagnóza, pouze suspekce.

G-pruhování je nejčastěji používanou metodou vizualizace chromosomů při hodnocení karyotypu. Spočívá v částečné degradaci proteinové složky chromatinu a následném obarvení Giemsovým roztokem (namísto barvení podle Giemsy-Romanowského se používají i podobná barviva, např. Wrightova modifikace). Chromozom je pak rozdělen na tmavé a světlé příčné pruhy, jejichž střídání je pro každý chromozom charakteristické. Grafickým znázorněním chromozomu je tzv. **idiogram**.

G-pruhy jsou základem tzv. **ISCN** (Internationale Systematic Chromosome Nomenclature, poslední úprava 2005), což je mezinárodní norma závazná pro popis chromozomálních aberací.

Příklady zápisu:

- 1) **46,XY** je normální mužský karyotyp
- 2) **46,XY,+21** znamená trizomii 21. chromozomu u mužského pohlaví, klinicky Downův syndrom
- 3) **46,XX,del(15)(q11q13)** znamená intersticiální delecii části dlouhých ramen chromozomu 15, mezi pruhy q11 a q13, klinicky – v závislosti na původu deletovaného chromozomu – dívku s Prader-Willi nebo Angelmanovým syndromem.

Další klasické barvicí metody jsou používány vzácně (**R-pruhování** – reverzní ke G pruhům, AgNOR) anebo už byly nahrazeny modernějšími technikami (**Q-pruhování**, **C-pruhování**).

C-pruhování je technika užívaná ke zvýraznění **konstitutivního heterochromatinu**, t.j. chromatinové hmoty geneticky inaktivní proto, že není tvořena funkčními geny, ale směsí tzv. satelitních DNA, sestávajících z repetitivních úseků DNA. Proto změna jejich rozsahu nemá fenotypový efekt. Vyskytují se v centromerách a přilehlých oblastech a ve značném rozsahu na dlouhých ramenech chromosomů 1, 9, 16 a Y. Funkční DNA geny nejsou obsaženy ani v krátkých ramenech akrocenrických chromosomů skupiny D a G. Ta jsou složena kromě satelitních DNA též z genů pro ribozomální DNA a lze je vizualizovat metodou barvení stříbrem (AgNOR; NOR = nukleolární organizátor neboli aktivní rRNA geny; proteiny v jejich okolí váží stříbro).

Z výše uvedeného vyplývá, že zápisy **46,XX,9qh+** (zvětšený rozsah heterochromatinu na chromozomu 9) nebo **46,XX,15ps+** (zvětšení krátkých ramen chromozomu 15) popisují ve skutečnosti varianty normálního ženského karyotypu a podle doporučení Evropské cytogenetické asociace (ECA) je vhodnější používat pouze zápis **46,XX**.

V genetice se také můžeme setkat s pojmem **fakultativní heterochromatin**, což představuje euchromatin dočasně inaktivní. Tento pojem se obvykle spojuje s jedním ze dvou chromozomů X u žen (nebo mužů s Klinefelterovým syndromem), případně i jiného chromozomového úseku, který byl po translokaci (X;autozom) do inaktivní oblasti přemístěn. K inaktivaci chromozomu X, pozorovaného pak v buňkách jako Barrovo tělísko nebo pozdě se replikující X, dochází v buňkách zpravidla náhodně. Můžeme takto vysvětlit mírné příznaky X-vázaných recesivních onemocnění u žen, eventuálně některé nesrovnalosti mezi genotypem a fenotypem. V případech translokací (X;autozom) může být euchromatin přemístěný z autozomu na X též inaktivován. U nosiček takovéhoto chromozomálních přestaveb je sice častěji inaktivován normální chromosom X, ale toto pravidlo má řadu variant. Můžeme se proto setkat s mírnými odchylkami fenotypové normy v případech vyvážených translokací a naopak méně výraznými abnormitami fenotypu nosiček nebalancovaných přestaveb.

In situ hybridizace, FISH

Drahuše Novotná, Daniel Chudoba

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

In situ hybridizace představuje kombinaci metod cytogenetické a molekulární diagnostiky, proto také je užíváno označení „**molekulární cytogenetika**“. Technika v sobě zahrnuje denaturaci dvou DNA, jedné se známou sekvencí a druhé vyšetřované, avšak bez nutnosti izolace DNA ze vzorku vyšetřované tkáně. Hybridizujeme totiž sondu, DNA, jejíž lokalizaci v genomu známe, s chromozomy, buněčnými jádry či tkáňovými řezy přímo na preparátech. Aby se sonda na komplementární cílovou sekvenci vážala přednostně, musí být obsažena ve směsi ve vyšší koncentraci než DNA vyšetřovaná. Sonda je značena fluorescenčním barvivem, buď přímo nebo přes systém antigen – protilátka. Druhá metoda je náročnější, ale umožňuje opakování procesu značení a tím i zesílení fluorescenčního signálu.

K vizualizaci signálů, a tedy hodnocení výsledků, se využívá fluorescenční mikroskop.

Ten se od běžného optického mikroskopu liší tím, že zdrojem světla je rtuťová výbojka, která emituje záření v oblasti blízké UV oblasti spektra. Dříve než záření dopadne na preparát, prochází excitačními filtry. Fluorescenční barviva obsahují v molekulách reaktivní skupiny. Následkem excitačního záření dochází k excitaci elektronů. Při jejich návratu do původních energetických hladin dojde k emisi záření, které pak po usměrnění bariérovým filtrem pozorujeme.

V praxi je třeba vždy kombinovat konkrétní typy filtrů s použitými fluorochromy. Nejvíce používanými fluorescenčními barvivy jsou DAPI (diaminophenyl-indol), který slouží k podbarvení vyšetřovaného materiálu, tj. chromosomů a jader – tzv. counterstaining. K detekci specifických lokusů jsou nejčastěji používány FITC (fluorescein-isothiokyanát), který pozorujeme jako zelený signál, a TRITC (tetramethylrhodamin), pozorovaný jako červený signál. Následkem excitačního záření i vlastní fluorescence proteinů se na preparátu objevují i další, rušivé signály, které je třeba co nejlépe eliminovat.

Postup ISH (= in situ hybridisation) je následující:

1. příprava preparátů – podobně jako pro klasickou cytogenetiku do fáze nakapání preparátů, ty jsou pak dehydratovány vzestupnou alkoholovou řadou
2. nakapání sondy na preparát (v některých případech se přidává později)
3. denaturace sondy a cílové DNA (někdy se provádí odděleně) několik minut vysokou teplotou s přidáním formamidu; používá se buď vodní lázeň nebo hybridizační destička
4. hybridizace sondy a cílové DNA – k tomu je nutno navodit reasociační podmínky, probíhá v termostatu při 37°C podle typu sondy od 30 minut po 24 hodin i déle
5. odstranění nespecifických signálů – vznikají proto, že se sonda naváže i na sekvence, k nimž není úplně komplementární, eliminace se provádí horkým SSC nebo roztokem formamidu
6. obarvení chromosomů a interfázních jader, tzv. counterstaining
7. hodnocení signálu s využitím fluorescenčního mikroskopu, případně speciálního počítačového programu

Každý typ sondy vyžaduje specifické mírné úpravy základního protokolu. Komerčně vyráběné próby jsou dodávány s doporučeným pracovním návodem.

Typy sond a jejich využití

- a) **satelitní čili centromerické sondy**, jež lze využít ke zjištění přítomnosti, ev. počtu kopií určitých chromozomů, k hodnocení mozaicismu, i na interfázních jádrech, bez nutnosti metafázních chromozomů;
- b) **lokus-specifické sondy** – užívají se k vyšetřování mikrodelecií a amplifikací, subtelomerických přestaveb a některých typů translokací, lze použít i na interfázních jádrech;
- c) **celochromozomové (malovací čili paintingové) sondy** – užívají se k hodnocení chromozomových přestaveb, je nutno aplikovat na metafázní chromozomy.

Zápis výsledků FISH podle ISCN obsahuje specifické zkratky: *ish* = in situ hybridizace, *nuc ish* = hybridizace na buněčných jádrech, *wcp* = celochromozomová sonda, *cen* = centromerická sonda a dále charakteristiky použitých sond, resp. počet kopií daného lokusu.

Příklady:

- a) **47,XY,+18** značí karyotyp chlapce či plodu s Edwardsovým syndromem
- b) **nuc.ish18cen(D18Z1x3)** je podobný výsledek, zjištěný interfázní FISH s použitím centromerické sondy pro chromosom 18; lokus D18Z1 je nalezen ve 3 kopiích
- c) **47,XY,+18.ish18cen(D18Z1x3)** znamená tentýž karyotyp zjištěný pruhovací metodou i FISH
- d) **46,XY.ishdel(7)(q11.23q11.23)(ELN-)** popisuje jedince mužského pohlaví s Williams-Beurenovým syndromem. Klasickou cytogenetikou byl nalezen normální karyotyp a metodou FISH zjištěna delece v pruhu 7q11.23 a to na základě absence jednoho signálu sondy pro oblast ELN obsahující gen pro elastin.

Podle poslední úpravy mezinárodní nomenklatury z roku 2005 se molekulárně cytogenetické zápisy zjednodušují a popis počtu hodnocených lokusů se vynechává.

MFISH a SKY jsou metody, které umožňují barevně rozlišit všech 24 druhů lidských chromozomů zároveň. K hybridizaci je použita směs rozdílně značených malovacích sond a preparáty s kvalitními metafázickými chromozomy. Při MFISH (multicolour FISH) jsou výsledky hybridizace hodnoceny sestavou minimálně šesti fluorescenčních filtrů, obraz je z mikroskopu snímán CCD kamerou do počítače a speciálním softwarem jsou rozlišeny barvy i barevné odstíny, které nejsou pro lidské oko dostatečně rozdílné. Metoda SKY (spectral karyotyping) funguje podobně, místo sady filtrů je použita „optická krychle“ obsahující spektrofotometr.

MBand (multicolour banding) má podobný princip, ale různě značenými sondami rozlišujeme nikoliv jednotlivé chromozomy, ale chromozomální segmenty.

Při **CGH** (comparative genome hybridisation) je na rozdíl od klasické FISH hybridizována vyšetřovaná DNA, izolovaná z jakékoli tkáně, s metafázními chromozomy normálního zdravého člověka. Kromě ní s týmiž chromozomy (na podložním skle) hybridizuje i DNA zdravého jedince. Obě DNA jsou značeny různými fluorophory a „soutěží“ o komplementární úseky chromozomů na podložním skle. Podle převažující intenzity toho či onoho signálu zjišťujeme deleci či amplifikaci příslušné oblasti genomu. Vzájemný poměr obou fluorescenčních signálů hodnotí opět počítačový program, který současně umožňuje přesný popis rozsahu delece či amplifikace. Metoda je vhodná k upřesnění dysbalancí karyotypu zjištěných nejprve G nebo R pruhováním. Její nevýhodou je nemožnost hodnocení reciprokých translokací, stejně jako lokalizace aberací v karyotypu.

Uvedené metody mají přibližně stejné rozlišení jako kvalitní pruhovací techniky (HRT = high resolution technique, max. 5-10 Mb).

K hodnocení submikroskopických aberací jsou vyvinuty metody „**microarray**“ resp. „**array CGH**“. V tomto případě jsou cílová a normální DNA hybridizovány nikoliv s chromozomy, ale s velkým počtem malých úseků genomu, jež jsou ve formě teček navázány na podložní sklo, tzv. čip, na němž je každý úsek přesně lokalizován. Jeden čip může obsahovat DNA celého genomu, jednoho či několika chromozomů nebo jen část chromozomu. Podle toho se liší velikost „teček“ a je dána citlivost vyšetření. Výsledky hybridizace jsou snímány speciálním skenerem a hodnoceny počítačovým programem.

Přehled využití jednotlivých cytogenetických metod:

Legenda: +.....lze použít, ale neprovádí se

++...vhodná metoda

+++...optimální metoda

METODA	NUMERICKÉ ABERACE	KRYPTICKÉ ABERACE	VĚTŠÍ STRUKTURNÍ ABERACE	ANALÝZA INTERFÁZNÍCH JADER MOŽNÁ	KONKRÉTNÍ VYUŽITÍ
pruhování chromozomů	+++	-	++	ne	základní cytogenetické vyšetření
centromerické sondy	+++	-	+	ano	prenatální a preimplantační genetika, analýza markerů
lokus specifické sondy	+	+++	++	ano	mikrodelece, subtelomerické přestavby, onkogenetika
malovací sondy	+	-	+++	ne	strukturální přestavby, onkogenetika
MFISH SKY	+	-	+++	ne	strukturální přestavby i komplexní, onkogenetika
MBand	-	-	+++	ne	analýza strukturálních přestaveb, delecí, onkogenetika
CGH	+	+++	+++ jen nebalancované	ano	nebalancované aberace onkogenetika
array CGH	+	+++	+++ jen nebalancované	ano	mikrodelece, screening submikroskopických aberací, onkogenetika

Výsledky cytogenetického vyšetření závisejí na technických možnostech pracoviště, erudici laboratorních pracovníků a také na přesné indikaci vyšetření, založené na pozorování a praxi klinického genetika a spolupracujících lékařů všech oborů.

Nádorová cytogenetika

Drahuše Novotná, Daniel Chudoba

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Nádorová cytogenetika se zabývá studiem získaných chromozomových změn v somatických buňkách nádorových nebo potenciálně nádorových tkání.

Po objevení tzv. filadefského (Ph) chromozomu, který je nalézán v kostní dřeni až u 95% nemocných s chronickou myeloidní leukémií, se předpokládalo, že bude nalezena abnormalita charakteristická pro každý typ neoplasie. To se sice nakonec nepotvrdilo, ale přesto jsou známy změny karyotypu, které se častěji vyskytují u nemocných s určitými malignitami, případně i abnormality, které jsou u téhož onemocnění asociovány s více či méně maligním průběhem onemocnění. Tak plní **onkocytogenetické vyšetření** úlohu metody diagnostické i prognostické. Tento systém je lépe prozkoumán u hematologických malignit, vzhledem k obtížnosti získání a kultivace solidních nádorů.

Karcinogenní látky, eventuálně vnitřní predispoziční faktory způsobují poškození chromozomů s následky dvojího druhu – buď aktivací **protonkogenu** (to mohou způsobit chromozomální translokace, inzerce, inverze, amplifikace, bodové mutace) anebo naopak inaktivací **tumor-supresorového genu** (vliv delecí, translokací, inverzí, inzercí, bodových mutací) na obou homologních chromozomech.

Ve druhém případě, kdy se tumor-supresorové geny chovají recesivně (tj. fenotypově se projeví při poškození obou homologních alel), můžeme nacházet na jednom homologu i konstituční, vrozené aberace. Poškození druhého párového chromozomu v buňkách příslušné tkáně vede potom ke ztrátě kontroly buněčného dělení a vzniku nádoru. Např. vrozená delece oblasti 11p13 vytváří predispozici k vývoji Wilmsova tumoru, delece 13p14 zase ke vzniku retinoblastomu.

Chromozomální změny, ke kterým dochází následkem zlomů a znovuspojení nesprávných částí chromozomů (translokace, inzerce, inverze), se projevují dvojím způsobem – buď se zlom objeví uvnitř genu na každém ze zúčastněných chromozomů a vytvoří se nový fúzovaný gen kódující chimerický protein anebo se geny s aktivační schopností dostanou do blízkosti protoonkogenu a tím jej aktivují.

Z první skupiny translokací, typických pro myeloidní leukémie, je nejznámější t(9;22)(q34;q11), při níž vzniká **Ph chromozom**, nesoucí **fúzní gen BCR/ABL**. Tato změna se vyskytuje u 95 % nemocných s CML a 25-30 % dospělých nemocných s akutní myeloidní leukémií.

Aktivace protoonkogenů je důsledkem translokací, které jsou nacházeny u lymfatických leukémií T- a B-typu, např. t(8;14)(q24;q32).

V nádorových tkáních se ovšem kromě základních aberací vyskytuje zároveň i řada více či méně specifických přestaveb i řada klonů s různými aberacemi. Ty jsou často velmi složité a při podobnosti chromozomových segmentů za použití G-pruhování nelze karyotyp správně popsat. Tato situace se ovšem s nástupem FISH radikálně změnila.

Cytogenetická preimplantační diagnostika

Drahuše Novotná, Daniel Chudoba

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Preimplantační diagnostika je testování pohlavních buněk a embryí cytogenetickými a molekulárně genetickými technikami.

Při **cytogenetickém preimplantačním vyšetření** s využitím interfázní FISH se snažíme vyloučit z procesu oplození embrya nesoucí numerickou či nebalancovanou strukturální přestavbu. Páry s vysokým rizikem mohou tímto způsobem předejít opakovaným spontánním abortům nebo UPT po prenatalní diagnostice.

FISH provádíme na jedné buňce, což vyžaduje specifický pracovní protokol. Z obvykle osmibuněčného embrya je speciální mikropipetou odebrána jedna blastomera, její ztrátu v dalším vývoji organismu nahradí ostatní embryonální buňky.

V některých zemích je zásah do embrya vyloučen zákonem, proto se jako alternativa využívají **polární tělíska** – buňky, které se vydělují při dozrávání vajíčka. Při 1. meiotickém dělení vzniká 1. polární tělísko, které je diploidní, při 2. meiotickém dělení druhé, haploidní polární tělísko. Abnormalita zjištěná na polárním tělísku je zrcadlovým obrazem abnormality oocyty – např. nulizomie v 2. polárním tělísku znamená dizomii chromozomu ve vajíčku. Při studiu polárních tělísek je ovšem z vyšetření vyloučen otcovský faktor.

Screeningové sety obsahují sondy pro nejčastější trizomie nalézané in vivo a ve spontánních abortech, tj. pro chromozomy 13, 15, 16, 18, 21, 22, X a Y, obarvené různobarevnými fluorophory. Aplikují se obvykle ve dvou skupinách na každou vyšetřovanou blastomeru, mezi dvěma hybridizacemi je první várka sond odmyta a druhá aplikována na téže buňky.

Při selekci embryí u nosičů balancovaných robertsonských translokací jsou použity obvykle sondy pro dlouhá ramena každého zúčastněného akrocentru. Na blastomeře s normálním či vyváženým karyotypem pozorujeme dva signály pro každý chromozom. Při vyšetřování embryí u nosičů reciprokových translokací používáme sondy pro krátká i dlouhá ramena a také pro centromery chromozomů zavzatých do translokace. V testované buňce je třeba najít správnou barevnou kombinaci všech použitých sond, aby mohlo být embryo považováno za zdravé.

I když jsou tyto metody velkým přínosem pro páry s poruchami reprodukce, je třeba mít na paměti, že jsou vyšetřovány jen některé chromozomy a ne celý karyotyp – zde nadále zůstává klasická prenatalní diagnostika. Také jsou na poli odborném i laickém stále uvažovány možnosti poškození embrya při mechanickém zásahu do jeho vývoje.

Laboratoř pro tkáňové kultury

Daniel Chudoba, Drahúše Novotná

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Kultivace buněk v tkáňových kulturách je nezbytným předpokladem úspěšného cytogenetického vyšetření, pouze kultivací získáme dostatečné množství buněk pro zastavení buněčného dělení v metafázi. Dlouhodobé kultivace buněk jsou též nezbytné pro biochemická vyšetření, molekulárně genetická vyšetření, vyšetření HLA z kožních fibroblastů a kryoprezervaci. Kultivací získáme stovky tisíc až milióny buněk.

Na Oddělení lékařské cytogenetiky Ústavu biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha kultivujeme buňky pro všechny tyto účely. Kultivace a kryoprezervace buněk má na pracovišti velkou tradici. Zajištění kvalitních podmínek umožňuje dlouhodobě dosahovat vysoké kultivační úspěšnosti, a tím i zajišťovat dostatek buněčného materiálu pro následná vyšetření v rámci prenatální, tak i postnatální diagnostiky.

V kryobance jsou uloženy materiály po tři desetiletí. Zpětnou kontrolou jsme ověřili, že buňky jsou schopny po rozmrazení úspěšně založit tkáňovou kulturu po 25 letech uložení v bance v prostředí kapalného dusíku.

Laboratoř pro tkáňové kultury, vybavení a materiál

Kultivace provádíme za přísně sterilních podmínek v boxe pro tkáňové kultury.

V těchto prostorách je zaveden přísný **hygienický režim** s omezením vstupu osob.

Úklid je prováděn podle rozpisu desinfekčních prostředků, které jsou pravidelně obměňovány. Prostory jsou pravidelně vyzařovány stropními UV lampami, které jsou spínacími hodinami zapínány mimo pracovní dobu. Veškeré nástroje a pomůcky jsou ihned po použití namáčeny do desinfekčních roztoků a později likvidovány dle zavedených postupů pro zacházení s rizikovými odpady. Sterilní práce je prováděna v biohazardech s vertikálním prouděním vzduchu, který je filtrován ve vestavěných filtrech. Vnitřní prostory biohazardů jsou před, mezi a po ukončení sterilní práce vyzařovány UV lampami.

Mezi nezbytné **vybavení boxu pro tkáňové kultury** patří CO₂ inkubátory, centrifuga, inverzní mikroskop, pipetovací zařízení, lednice a mrazáky pro uskladnění vzorků, kultivačních médií, sér a dalších pomocných roztoků pro práci s tkáňovými kulturami.

Většina kultivací, jak krátkodobých, tak dlouhodobých, je prováděna v plastových kultivačních nádobách pro jedno použití, téměř úplně jsme nahradili dříve používané skleněné kultivační nádoby. Sklo zčásti používáme ještě u pipet, odměrných válců a plazmavek, které jsou myty v myčce tkáňového skla v ústavní umývárně. V těchto prostorách je též umístěno několikastupňové zařízení pro přípravu vody pro tkáňové kultury, která je využívána v myčce pro závěrečné oplachy a pro přípravy roztoků v laboratořích. V následných prostorách je pak umyté sklo, zátky a nástroje sterilizováno autoklávováním nebo horkovzdušnou sterilizací.

Pro kultivace používáme většinou komerčně dodávaná **kultivační média**.

Při krátkodobých kultivacích venózní a pupečnickové krve používáme médium **RPMI 1640** obohacené stabilní formou glutaminu. Do média přidáváme fetální telecí sérum, phytohemaglutinin (forma M) a gentamycin.

Pro dlouhodobé tkáňové kultury používáme médium **GPM3E**, které je založeno na bázi média 199, které je obohaceno růstovými proteiny telecího séra. Toto obohacení nám umožňuje pracovat s nižšími koncentracemi fetálního telecího séra (10 %, 7,5 %, 5 %, 2,5 %, 0%). Přidáváme gentamycin. V současné době je používáno zejména jako odběrové,

preparační a transportní médium. Je velmi vhodné pro závěrečnou kultivaci již rozběhlých tkáňových kultur fibroblastů před jejich konečným zpracováním.

Kultivační médium **AmnioMax** je dvousložkové (C100 Basal Medium a C100 Supplement s glutaminem) speciální médium, určené pro dlouhodobou kultivaci choriových klků a buněk plodové vody, popřípadě může sloužit jako médium pro zakládání primokultur všech kultivačních skupin. Před použitím je třeba zmrazenou složku opatrně rozmrazit a potom sterilně přidat ke složce tekuté. Do takto připraveného média přidáváme gentamicin, fetální telecí sérum se nepřidává.

Kultivační médium **MAC** se používá pro kultivace buněk plodové vody a choriových klků. Toto médium vyžaduje při kompletaci pro použití přísad 20 až 25 % fetálního telecího séra a antibiotik.

Kultivační médium **MEM** používáme při kultivaci kožních fibroblastů jako alternativu k médiu GPM3E. Při kompletaci média k použití přidáváme 10 % fetálního telecího séra a antibiotika. **Fetální telecí sérum** se přidává do kultivačních médií pro jejich vylepšení, jedná se o tzv. nedefinovanou složku, která pomáhá zejména při zakládání tkáňových kultur a napomáhá k uchycení buněk ke kultivační ploše.

Pro další práci s tkáňovými kulturami používáme roztok **Versen trypsinu** pro uvolňování buněk z kultivační plochy do buněčné suspenze. Při tomto procesu dochází k zakulacení buněk, a tudíž k jejich snadnému sklepnutí z kultivační plochy. Tohoto efektu se využívá vždy, když potřebujeme buňky uvolnit, neboť pro další postupy je nutná příprava buněčné suspenze. Je to při pasážování, přípravě pro molekulárně genetické a biochemické vyšetření, při přípravě preparátů pro cytogenetické a molekulárně cytogenetické vyšetření a při kryoprezervaci.

Pro blokádu buněčného dělení se využívá působení **Colcemidu**, který do tkáňových kultur přidáváme na posledních 1,5 až 3,5 hodiny kultivace. Při zkrácení doby působení Colcemidu se zvýší kvalita chromozómů, ale sníží počet zachycených dělicích se buněk, při prodloužení délky působení se zvýší počet dělicích se buněk, ale zhorší se kvalita chromozómů. Zvýšenou spiralizací dochází ke značnému zkrácení délky chromozómů, a tím i ke snížené hodnotitelnosti tohoto materiálu. Délku lze prodloužit na 18 až 24 hodin u velmi špatně rostoucích tkáňových kultur, kdy při normální délce působení Colcemidu bude záchytnost dělicích se buněk velmi nízká.

Phytohemaglutinin přidáváme do kultivačního média RPMI 1640 pro stimulaci dělení lymfocytů při kultivaci plné venózní krve. Bez přidání phytohemaglutininu nedojde k dělení buněk a kultivace by byla neúspěšná.

PBS a fyziologický roztok slouží pro resuspendování buněk po uvolnění z kultivační plochy lahvičky, takto připravené buněčné suspenze předáváme pro molekulárně genetická a biochemická vyšetření.

Zmrazovací médium **Cell Culture Freezing Medium DMSO** slouží pro přípravu konečné buněčné suspenze pro kryoprezervaci buněk.

Kapalný dusík svou teplotou -196°C zpomaluje biochemické pochody v buňkách na minimum, a tím umožňuje jejich dlouhodobé uložení bez ztráty schopnosti založit tkáňovou kulturu po jejich rozmrazení. Nejstarší materiály v naší bance jsou uloženy již 30 let.

Tkáňové kultury

Daniel Chudoba, Drahuše Novotná

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Založení tkáňové kultury je rozhodující pro pozdější úspěšnost kultivace.

Tkáňové kultury dělíme na dlouhodobé a krátkodobé.

Krátkodobé tkáňové kultury kultivujeme řádově ve dnech. Jedná se o suspenzní kultury, kdy nedochází k uchycení buněk na kultivační plochu kultivační nádoby. Během krátkodobé kultivace neprovádíme kompletní výměny média ani pasáže, kultura vystačí s kultivačním médiem do kterého byla založena. Kultivujeme při 37⁰C v inkubátoru s upravenou atmosférou na 5 % CO₂.

Krátkodobě kultivujeme zejména **venózní krev pro** stanovení karyotypu (72 hodin) a pro stanovení získaných chromozomálních aberací (ZCA) (48 hodin). Obdobným způsobem kultivujeme **pupečnickovou krev** získanou kordocentézou v rámci prenatální diagnostiky (48 nebo 72 hodin).

Krátkodobě lze též kultivovat **choriové klky** pro chromozomální vyšetření (24 hodin), ale toto vyšetření se v současné době na našem oddělení neprovádí.

Dlouhodobé tkáňové kultury kultivujeme řádově v týdnech až měsících. Do této kultivační skupiny řadíme dlouhodobé kultivace **buněk plodové vody** (2 až 4 týdny, výjimečně i déle), **choriových klků** (2 až 4 týdny, výjimečně i déle), **materiálů z potratů** (2 až 8 týdnů, výjimečně i déle), **kožních a svalových biopsií, nádorů a biopsií jiných orgánů** (3 až 9 týdnů). Jedná se tkáňové kultury, kde buňky kultivujeme přisedlé na kultivační ploše.

Při práci s dlouhodobými tkáňovými kulturami provádíme kompletní výměny kultivačního média, pasážování a zpracování přisedlých buněk do buněčné suspenze.

Dlouhodobé kultivace jsou v základě dvojího typu. Dělíme je podle způsobu zakládání primární tkáňové kultury.

Prvním typem je **kultivace buněk plodové vody**, kdy odběrem (amniocentézou) získáme suspenzi buněk v plodové vodě. Obvykle se odebírá 20 ml plodové vody nejčastěji mezi 17. až 19. týdnem gravidity, která je do laboratoře dodávána ve dvou zkumavkách. Plodová voda je za normálních podmínek nažloutlá tekutina lehce zakalená buněčným obsahem, nemělo by docházet ke kontaminaci krví, erytrocyty velmi ztěžují kultivaci tím, že obsadí kultivační plochu a je komplikováno uchycení a následný rozvoj buněk plodové vody. K částečnému nebo úplnému odstranění kontaminace krví dochází při prvních kompletních výměnách kultivačního média.

Zkumavky dáme centrifugovat k oddělení buněčného sedimentu a supernatantu, který není ke kultivaci vhodný.

V některých případech je požadavek na provedení vyšetření z nativní plodové vody. Bývá to většinou pro vyšetření při riziku cystické fibrózy a nebo pro metodu QFPCR při vysokém týdnu gravidity či při vysokém riziku postižení plodu vrozenou chromozomální vadou. V těchto případech odebíráme před centrifugací 1 až 2 ml plodové vody a předáváme k příslušnému vyšetření.

Po provedení centrifugace při 1000 ot./min. odebereme supernatant. Část poslouží k biochemickému, popř. virologickému vyšetření, část uchováváme zamrazeno v bance pro případné doplňující vyšetření.

Buněčný sediment je resuspendován v kultivačním médiu a po přenesení suspenze do kultivační lahvičky je založena tkáňová kultura. Z každé zkumavky je jedna kultura a tyto kultury jsou odděleně kultivovány po celou dobu probíhajícího vyšetření.

Lahvičky jsou umístěny do inkubátoru, prvních několik hodin s povolenou zátkou pro upravení pH kultivačního média, což je pro úspěšnou kultivaci buněk plodové vody v počáteční fázi velmi důležité.

Tkáňovou kulturu ponecháváme bez manipulace v inkubátoru 5 až 7 dní. Po této době provádíme první kontrolu růstu pomocí inverzního mikroskopu, mělo by docházet k tvorbě prvních kolonií. Zároveň provádíme první kompletní výměnu kultivačního média. Tímto krokem odstraníme staré médium s neuchycenými buňkami, drtí z rozpadlých odumřelých buněk, popřípadě erytrocyty. Je zároveň znovu upraveno pH a doplněny živiny pro zdárný růst tkáňové kultury.

V další fázi již kontrolujeme tkáňové kultury každý den, provádíme v případě nutnosti další kompletní výměnu média. V rozmezí 8 až 12 dne vybíráme vhodné kultury pro první kolcemidovou blokádu pro první cytogenetické vyšetření. Druhá paralelní kultura je potom pasážována většinou kolem 12. dne kultivace. Tímto úkonem získáme další tkáňovou kulturu pro opakované cytogenetické vyšetření a jednu rezervní lahvičku. Kolcemidovou blokádu provádíme většinou již druhý den po pasáži, kdy je ještě možno uvažovat o určité synchronizaci buněčného cyklu. V dalším pokračování již o synchronizaci nelze uvažovat, neboť tkáňová kultura buněk plodové vody je směsí různých typů buněk ve škále začínající fibroblasty a konče epiteliálními buňkami s dalšími přechodnými typy.

Druhá lahvička vzniklá pasáží je buď rezervou pro případné další pokračování cytogenetického vyšetření nebo pro vyšetření mutací CFTR genu při nízkém GGT z biochemického vyšetření supernatantu plodové vody a normálním chromozomálním nálezem. Pokud se nepovede vystihnout správný okamžik pro kolcemidovou blokádu ve stádiu **primokultury**, přistupujeme k pasážování obou paralelních lahviček a kolcemidovou blokádu provádíme až po pasážování. K pasážování obou kultur přistupujeme též v případech, kdy je indikováno biochemické nebo molekulárně genetické a molekulárně cytogenetické vyšetření kultivovaných buněk plodové vody. Opakovaným pasážováním je možno namnožit dostatečné množství buněk pro tato vyšetření. Podobně je třeba pomnožit buňky pro kryoprezervaci.

Druhým typem je **kultivace fragmentovou metodou**, kterou používáme pro kultivaci materiálů získaných biopsií. Jsou to zejména choriové klky, kůže, sval, obdobným způsobem kultivujeme v naší laboratoři např. nádorovou tkáň.

Odběr se provádí do lahvičky s kultivačním médiem GPM3E a materiál by měl být neprodleně transportován do naší laboratoře. Pokud okamžitý transport není možný, je třeba materiál uchovávat v chladu při 4⁰C, nesmí být zmrazen, neboť by došlo k nevratnému poškození buněk a kultivace by byla neúspěšná.

Po obdržení materiálu přikročíme k jeho preparaci v Petriho misce v kultivačním médiu GPM3E. Odstraníme krevní sraženiny, tukové příměsi a u choriových klků provedeme separaci mateřské tkáně. Opakovanou výměnou preparačního média odstraníme většinu uvolněných erytrocytů. U choriových klků je pro správnou následnou diagnostiku velmi pečlivá separace mateřské tkáně. Preparaci provádíme pomocí preparačního mikroskopu.

Po této přípravné fázi následuje fragmentace tkáně na malé fragmenty pomocí skalpelu, nůžek a pinzety. Je důležité provádět čisté řezy pro snazší uchycení fragmentů tkáně ke kultivační ploše lahvičky. Takto fragmentovaný materiál je přenesen do kultivační lahvičky pomocí pipety nebo pasterky v malém množství kultivačního média AmnioMax. Doporučuji 1,5 ml média na lahvičku s kultivační plochou 25 cm² a založit nejméně dvě paralelní kultury. Pro zahájení kultivace upravíme pH kultivačního média povolením zátky na několik hodin, Je vhodné s takto založenou tkáňovou kulturou neprovádět žádné manipulace a ponechat ji v inkubátoru při 37⁰ C a 5 % CO₂ dva až tři dny.

Následně provedeme první kontrolu v inverzním mikroskopu, provedeme kontrolu růstu, pH kultivačního média a celkového stavu tkáňové kultury. Většinou po této době dochází ke sporadickému prvnímu vycestování buněk a k jejich uchycení na kultivační plochu v bezprostřední blízkosti fragmentu. V této fázi kultivace fragmenty drží ke kultivační ploše lahvičky je slabě a manipulace musí být velmi šetrná. Většinou není třeba žádných zásahů do tkáňové kultury. Následně vyhodnocujeme kultivaci každodenně. Dochází-li již ke tvorbě kolonií z vycestovaných buněk, je třeba přikročit k přidání čerstvého média v množství 1-2 ml. Při dalším úspěšném růstu a tím i k pevnějšímu ukotvení fragmentů ke kultivační ploše přikročíme k opatrné kompletní výměně kultivačního média. Ve vhodném okamžiku provedeme pasáž, která umožní tkáňové kultuře další růst. V zahuštěných koloniích dochází k dělení buněk pouze na periférii, neboť efekt kontaktní inhibice zastaví růst, zdravé normální buňky za normálních podmínek kultivace vytvářejí na kultivační ploše lahvičky pouze jednovrstvu. V takto přehuštěných středech kolonií snadno dochází k degeneraci a odumírání buněk. Odlišně se chovají nádorové buňky, které mají ztrátu kontaktní inhibice a vytvářejí v kultuře trojrozměrné útvary.

Další práce s kulturami fragmentového typu je shodná jako u dlouhodobých kultivací buněk plodové vody.

Doplnění kultivačního média bez jeho kompletní výměny používáme při dlouhodobé kultivaci fragmentovou metodou v počátcích kultivace a slouží k doplnění živin a částečné úpravě pH kultivačního prostředí.

Kompletní výměna kultivačního média je na našem pracovišti prováděna pouze u dlouhodobých kultivací. V principu se jedná o jeden ze základních úkonů práce s tkáňovými kulturami, slouží k dodání nových živin, úpravě pH a v druhé řadě k odstranění produktů metabolismu a odumírání buněk. Kompletní výměna média je prováděna slítím původního média nebo jeho odsátím pipetou, následuje ihned doplnění nového média.

Pasáž je na našem pracovišti používána u dlouhodobých kultivací. Při vytvoření jednovrstvy s těsným kontaktem buněk dochází u normálních buněk ke kontaktní inhibici a tím k zastavení růstu tkáňové kultury. Probíhá nadále metabolismus, snižuje se pH kultivačního média okyselením produkty metabolismu a dochází k postupné degeneraci tkáňové kultury. V první fázi postačí pro udržení kultury kompletní výměna média, ale v další fázi musíme kromě úpravy pH, vyředění produktů metabolismu a doplnění živin dát buňkám nový prostor pro dělení. Využíváme převedení buněk z přisedlého stavu do suspenze. Po resuspendování buněk v čerstvém kultivačním médiu rozdělíme buněčnou suspenzi, část ponecháme v původní lahvičce, část přeneseme do nové kultivační nádoby. Doplníme médium do obvyklého objemu a v inkubátoru necháme v klidu buňky sedimentovat na kultivační plochu. Po několika hodinách dojde k opětovnému uchycení buněk ke kultivační ploše a rozprostření z kulatého stavu do obvyklého tvaru buňky příslušného typu.

Transport tkáňových kultur

Daniel Chudoba, Drahuše Novotná

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Dlouhodobé tkáňové kultury je možno **transportovat** na jiná pracoviště k provedení indikovaných vyšetření.

Při **kratších vzdálenostech** zasíláme lahvičky s kulturami naležato s normálním množstvím kultivačního média. Při tomto způsobu transportu je třeba zajistit, aby lahvičky nebyly dlouhodobě nakloněny a části kultivační plochy nebyly bez média. Pro transport v tomto případě používáme kultivační médium, v kterém byla kultivace po celou dobu prováděna.

Při transportu používáme termoizolační kabely, které nám zaručí, že tkáňová kultura nebude poškozena nebo zničena výkyvy teplot, buňky nesmí být vystaveny mrazu ani vysokým teplotám, nejvhodnější pro transport je pokojová teplota.

Při **dlouhých transportech** zejména pro zahraniční vyšetření již musíme počítat s tím, že se může lahvička dlouhodobě dostat do polohy, která nezaručuje dostatečné pokrytí kultivační plochy médiem. Takovéto transporty zajišťujeme zasláním lahviček nastojato a úplným vyplněním objemu kultivační lahvičky kultivačním médiem. Pro dlouhodobý transport využíváme zejména médium GPM3E.

Ostatní podmínky musí být zachovány i v tomto případě, neboť by docházelo k nevratným poškozením buněk v transportované tkáňové kultuře.

Transport je též možný **ve formě buněčné suspenze v PBS nebo fyziologickém roztoku**.

Buňky uvolníme z kultivační plochy pomocí versen trypsinu, resuspendujeme a provedeme centrifugaci. Buněčný sediment znovu resuspendujeme v malém množství PBS nebo fyziologického roztoku a tuto suspenzi předáváme k provedení dalších diagnostických postupů. Tento způsob předávání využíváme zejména pro molekulárně genetická vyšetření.

Kryoprezervace tkáňových kultur

Daniel Chudoba, Drahúše Novotná

Ústav biologie a lékařské genetiky FN Motol a 2. LF UK Praha

Kryoprezervace buněčných linií je postup vedoucí k dlouhodobému uložení buněk v úložných kontejnerech s kapalným dusíkem. Takto zpracované a uložené buňky z tkáňových kultur je možno zpětně rozmrazit a použít pro tkáňové kultury, namnožené buňky je pak možno použít ke všem diagnostickým metodám, jsou zachovány veškeré vlastnosti buněk původní tkáňové kultury.

V přípravné fázi převedeme kultivované buňky z přisedlého stavu do suspenze. Po následné centrifugaci buněčný sediment resuspendujeme ve zmrazovacím médiu a rozplníme do speciálních ampulí určených pro uložení do kapalného dusíku. Jelikož zmrazovací médium obsahuje DMSO, který je při pokojové teplotě pro buňky toxický, je třeba ampule se vzorky nadále uchovávat v prostředí tajícího ledu do zahájení samotného zmrazovacího procesu.

Ten probíhá v počítačově řízeném zařízení, které umožní přesně dodržet plynulost a charakteristiky pro jednotlivé skupiny zamrazovaných materiálů.

Po ukončení programu jsou zamražené ampule umístěny v kontejnerech s kapalným dusíkem k dlouhodobému uskladnění.

O uložení je vedena pečlivá **počítačová dokumentace**, která umožňuje bezproblémové zpětné vyhledání materiálů v úložných kontejnerech s kapalným dusíkem. Je to velmi důležité, poněvadž se často jedná o materiály uložené mnoho let.

Při **zakládání tkáňové kultury z materiálů uložených v bance** provádíme rychlé rozmrazení v lázni 37⁰ C, po rozmrazení ihned přidáme k 1 ml buněčné suspenze 9 ml čerstvého kultivačního média AmnioMax, opatrně resuspendujeme, abychom nepoškodili křehké buňky a ihned vložíme do inkubátoru za normálních kultivačních podmínek. Tímto procesem dostatečně naředíme DMSO, centrifugace v tomto stavu není vhodná, dochází k větším ztrátám na buněčném materiálu. Pro úpravu pH povolíme na několik hodin zátky kultivačních lahvíček.

K uchycení buněk dochází během několika následujících hodin, do 24 hodin provedeme první kompletní výměnu kultivačního média, tím odstraníme zbytky DMSO a mrtvých neuchycených buněk.

Další kultivace probíhá podle běžných kultivačních pravidel pro zacházení s dlouhodobými tkáňovými kulturami.