



Metody badania polimorfizmu/mutacji DNA

Aleksandra Sałagacka

Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Farmakogenomiki

Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Mutacja

- **Mutacja** (*łac. mutatio – zmiana*)
 - zmiana materialnego podłoża dziedziczności, powodująca pojawienie się nowych cech dziedzicznych (*Kopaliński, 1994*)
- **Mutacja** - każda zmiana w sekwencji genomowego DNA (*Lewin, 1997*)
- **Mutacja** - proces w wyniku którego gen lub chromosom różni się od formy dzikiej (*Suzuki i in. 1989*).
- Mutacje mogą zachodzić w:
 - **komórkach somatycznych** - wówczas nie są przekazywane potomstwu (np. mutacje nowotworowe).
 - **gametach** - są przekazywane potomstwu i powodują zjawisko polimorfizmu.

Rodzaje mutacji

Z punktu widzenia struktury DNA najczęściej występującą formą są **mutacje punktowe** (SNPs):

- ▣ substytucja,
 - tranzycja: substytucja wewnątrz puryn (A, G) lub pirymidyn (T, C)
 - transwersja: substytucja między purynami i pirymidynami
- ▣ delecja,
- ▣ insercja
- oraz rzadziej:
 - ▣ mikro-delecje, -insercje,
 - ▣ inwersje_

Polimorfizm genetyczny

Polimorfizm (*gr. polymorphos – wielokształtny*) – wielopostaciowość

Polimorfizm genetyczny

- jednoczesne występowanie w populacji genomów zmienności allelicznej tj. różnych odmian tego samego genu (allele warunkujące różne fenotypy lub różny obraz fragmentów restrykcyjnych DNA) (Lewin 1997).

Najczęstsze typy polimorfizmy:

SNP – (*ang. single nucleotide polymorphism*)
polimorfizm pojedynczych nukleotydów

D/I – (*ang. deletion/insertion*)
delecja-utrata/insercja-wtrącenie

VNTR – (*ang. variable number of tandem repeats*)
zmienna liczba tandemowych powtórzeń

Mutacja a polimorfizm

- Przyczyną każdego polimorfizmu jest mutacja, ale...
- ...nie nie każda mutacja jest polimorfizmem.

Jeśli zmiana genetyczna (dany allel konkretnego genu) występuje w populacji z **częstością większą niż 1%**, mamy do czynienia z polimorfizmem

Metody wykrywania mutacji niezdefiniowanych

PCR-SSCP

- **Single strand conformation polymorphism**
– polimorfizm konformacji fragmentów jednoniciowych
- ssDNA przyjmuje w warunkach niedenaturujących unikalną strukturę drugo- i trzeciorzędową
- konformacja ta jest zależna od sekwencji nukleotydowej
- różne konformery różnią się ruchliwością elektroforetyczną
- **pojedyncze różnice w sekwencji**, wywołane mutacją punktową powodują **zróżnicowaną migrację** i charakterystyczne położenie **w żelu** poliakrylamidowym.



PCR-SSCP – etapy:



- 1) **reakcja PCR** – powielenie badanego fragmentu DNA
- 1) **denaturacja** dsDNA (silna zasada, formamid, wysoka temp.) - powstają ssDNA
- 1) **elektroforeza** żelowa ssDNA w warunkach niedenaturujących
- 1) **wykrywanie konformerów** pojedynczych nici w żelu (np. wybarwienie bromkiem etydy)

Wild type

PCR-amplified
fragments

Wild type

Labelled, denatured

Neutral polyacrylamide gel

Single stranded

Single stranded

Single stranded

Single stranded

Undenatured

Wild type

Unden

Den

Mutant

Unden

Den

Mutant

4

6

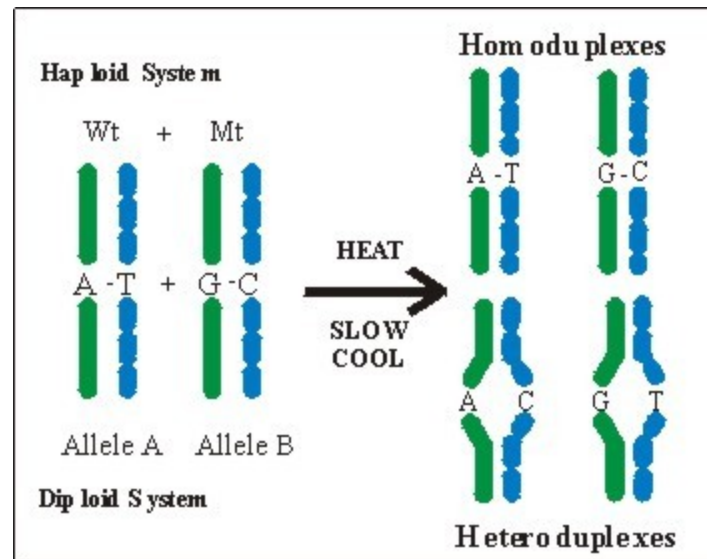
T

2

PCR-HDA

- **Heteroduplex analysis** - analiza heterodupleksów
- ssDNA, powstałe w procesie denaturacji dsDNA, podczas powolnej renaturacji łączą się przypadkowo w struktury dwuniciowe, tzw. dupleksy
- możliwe jest łączenie się nici w pełni do siebie komplementarnych (homodupleksy), jak i nie (heterodupleksy)
 - homozygoty – homodupleksy
 - heterozygoty – hetero- i homodupleksy

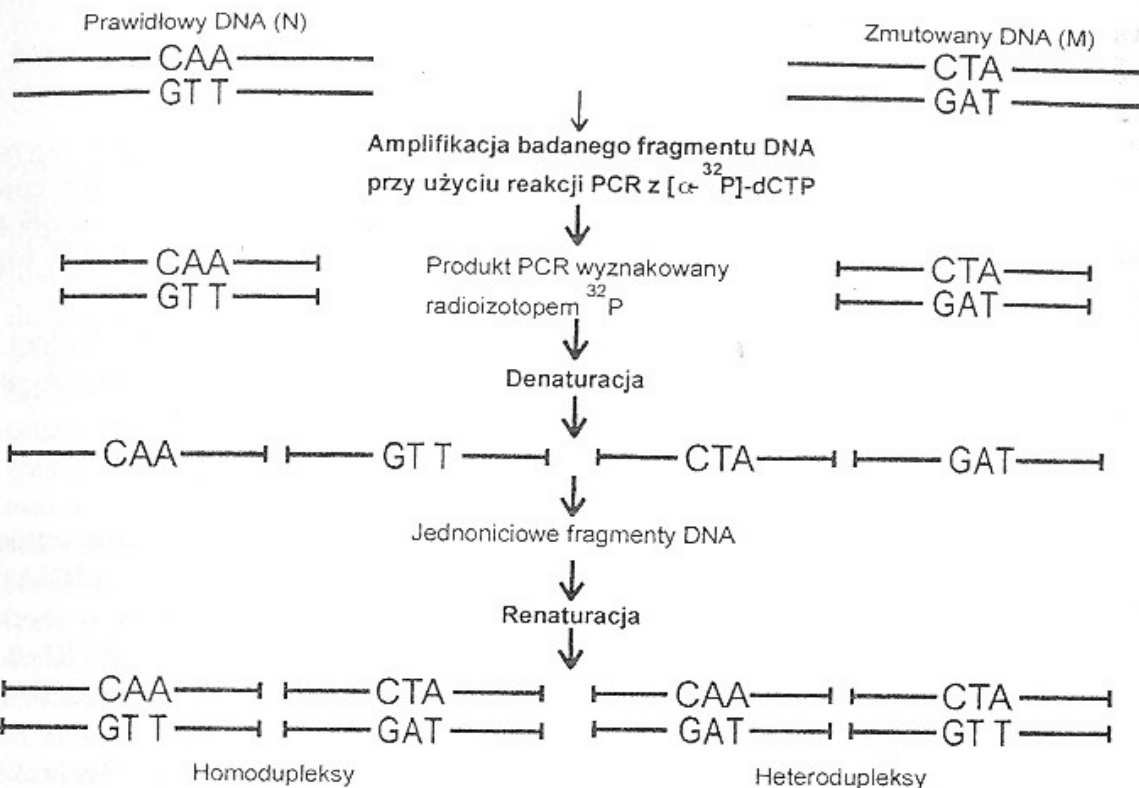
PCR-HDA



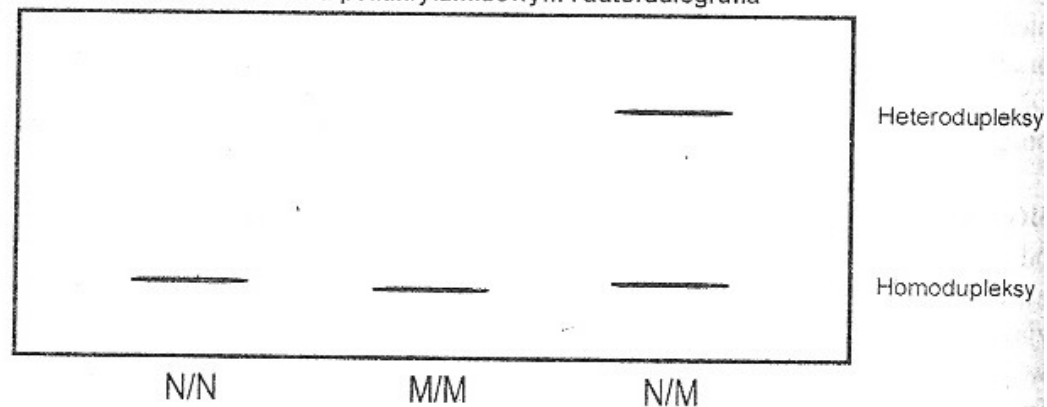
Heteroduplexy posiadają **mniej** ruchliwość elektroforetyczną (rozluźnienie struktury w miejscu niepełnego sparowania) niż homoduplexy.

HDA – etapy:

- 1) **reakcja PCR** – powielenie badanego fragmentu DNA
- 1) **denaturacja** dsDNA (wysoka temp.) – powstają ssDNA
- 1) **renaturacja** ssDNA – łączenie ssDNA w homo- i/lub heterodupleksy
- 1) **elektroforeza** dupleksów w żelu poliakrylamidowym
- 1) **wykrywanie dupleksów** w żelu (np. wybarwienie bromkiem etydyny)



Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym i autoradiografia



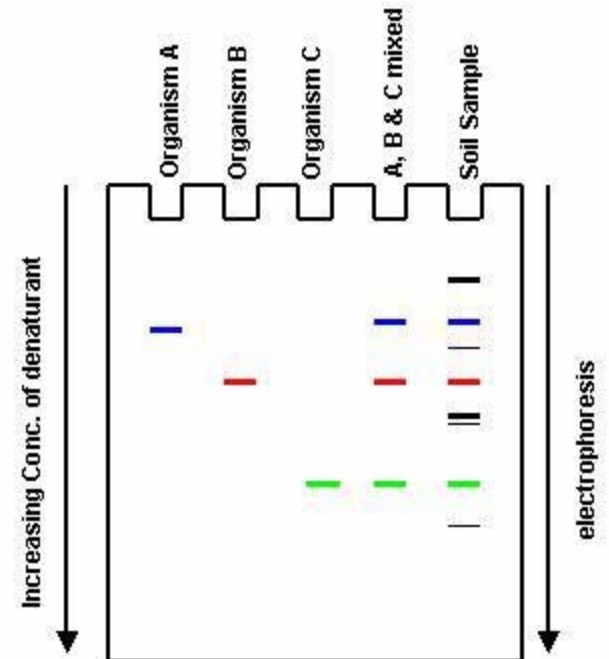
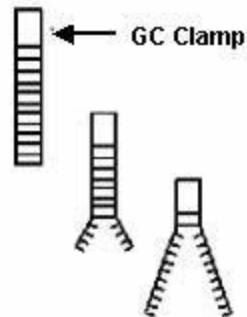
PCR-CMC

- **Chemical mismatch cleavage** – chemiczne rozszczepianie niesparowanych heterodupleksów
- podobnie jak HDA wykorzystuje zjawisko powstawania **heterodupleksów**
- **niesparowane zasady** w heterodupleksach poddaje się **modyfikacji chemicznej** (cytozyna – hydroksylamina, tymina – czterotlenek osmu)
- **zmodyfikowane cząsteczki DNA** ulegają **przecięciu** pod wpływem piperidyny → **zmiany w obrazie elektroforetycznym**

PCR-DGGE

- **Denaturing Gradient Gel Electrophoresis**
 - elektroforeza w żelu z gradientem czynnika denaturującego
- dsDNA ulega denaturacji przy **różnych stężeniach** związków denaturujących w zależności od **składu zasad i sekwencji nukleotydowej**
 - zw. denaturujące: formamid, mocznik, chlorowodorek guanidyny
- produkty PCR **o różnej sekwencji** będą w **rożnych miejscach żelu ulegać denaturacji** → **zmiany w obrazie elektroforetycznym**
- jeśli czynnikiem denaturującym jest temperatura – **PCR-TGGE**

PCR-DGGE



Metody wykrywania mutacji zdefiniowanych

PCR-RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphism polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

Enzymy restrykcyjne (restryktazy, endonukleazy)

- enzymy bakteryjne
- naturalny mechanizm obronny bakterii – ochrona przed wirusowym DNA (system restrykcji – modyfikacji)
- posiadają zdolność do rozpoznawania krótkich 4-8-nukleotydowych sekwencji DNA i ich przecinania

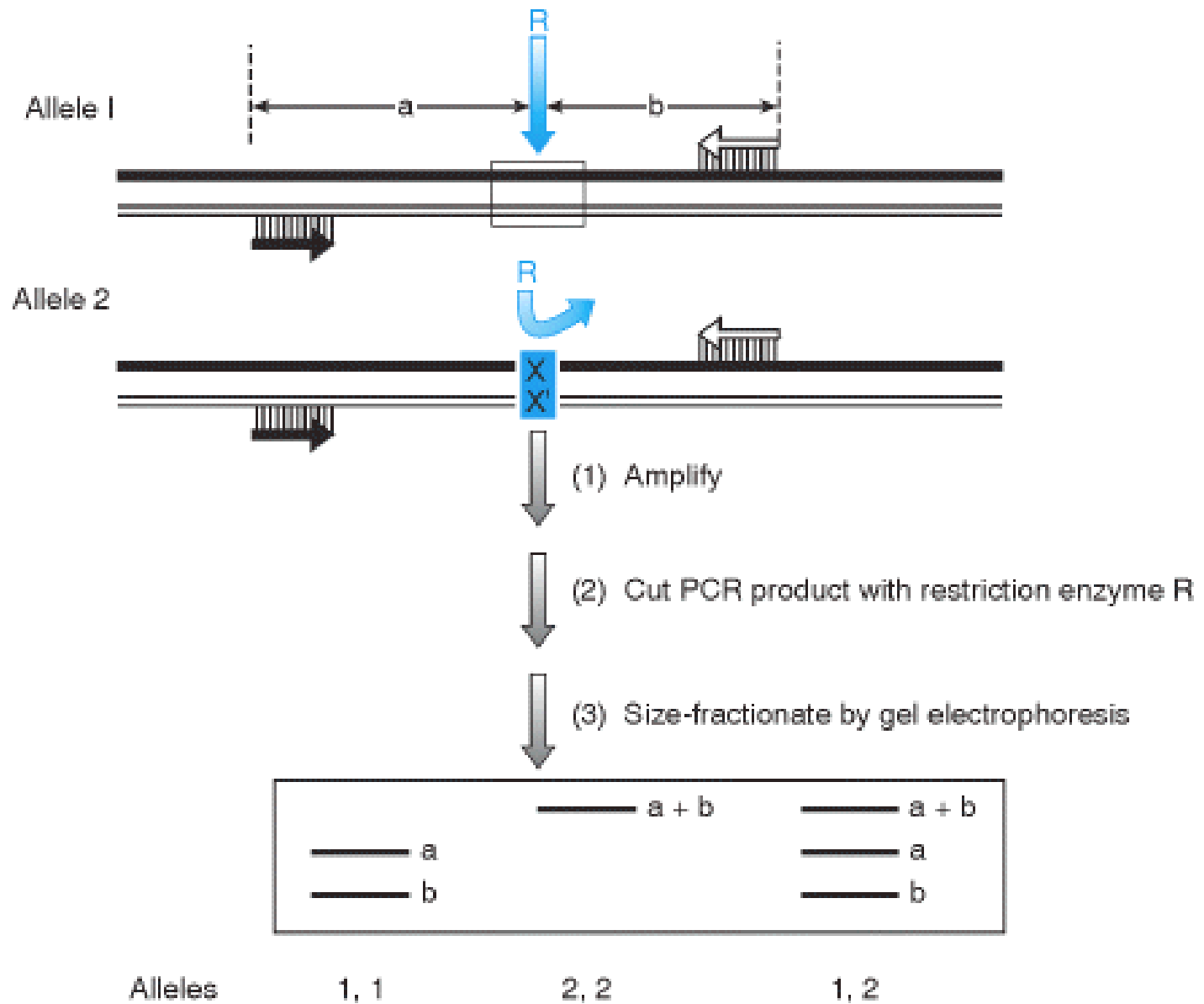
PCR-RFLP

- **Restriction Fragment Length Polymorphism**
– polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych
- **mutacja** powoduje powstanie lub zanik miejsca rozpoznawanego przez określony **enzym restrykcyjny**
→ **zmiana w obrazie elektroforetycznym** po trawieniu e. restrykcyjnym
(zmiana liczby i długości fragmentów DNA)

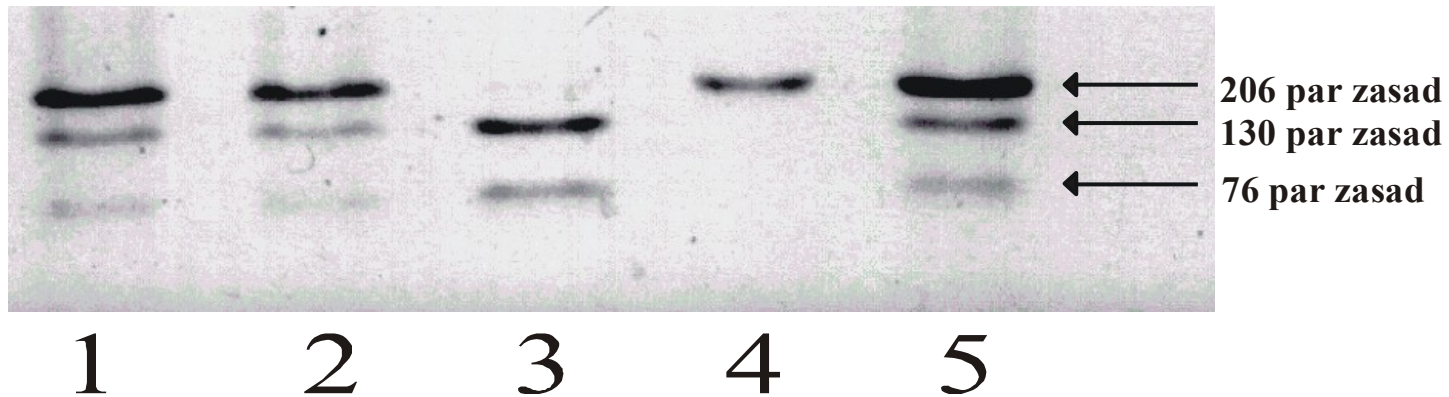
PCR-RFLP – etapy:

- 1) **reakcja PCR** – powielenie badanego fragmentu DNA
- 1) **trawienie** produktu PCR **enzymem restrykcyjnym**
- 1) **elektroforeza** produktu reakcji trawienia
- 1) **ocena wzoru prążkowego**





PCR-RFLP



ścieżki 1,2,5 – heterozygota CT

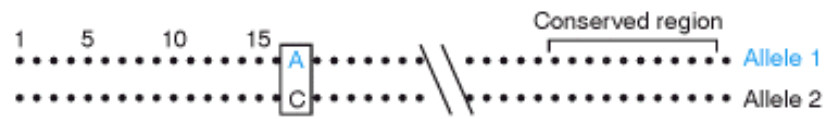
ścieżka 3 – homozygota CC

ścieżka 4 – homozygota TT

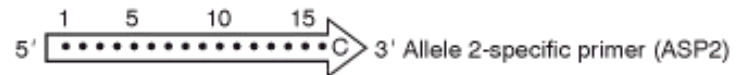
Allele Specific PCR (AS-PCR)

- **dwie równoległe** reakcje PCR dla tej **samej próby** badanej
- jeden starter **wspólny** dla obu reakcji
- drugi starter **swoisty dla sekwencji zmutowanej lub niezmutowanej** – komplementarny do sekwencji, w której możliwa jest zmiana mutacyjna
- ocena mutacji – **obecność/braku produktu** w obydwu reakcjach PCR



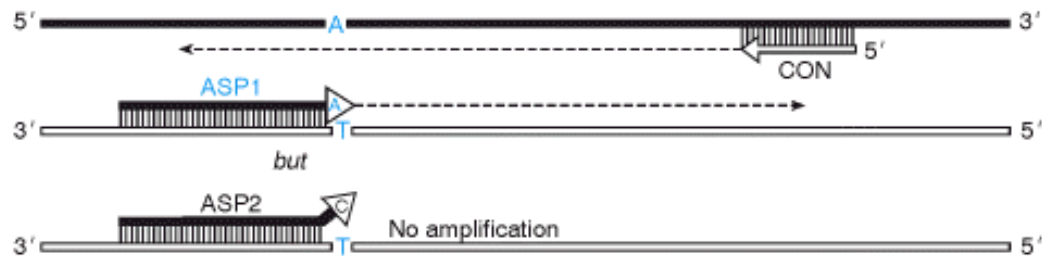


Design allele-specific primers (nucleotides 1-17)

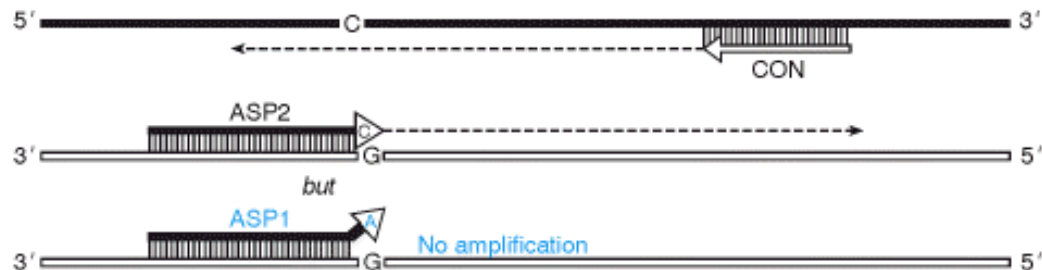


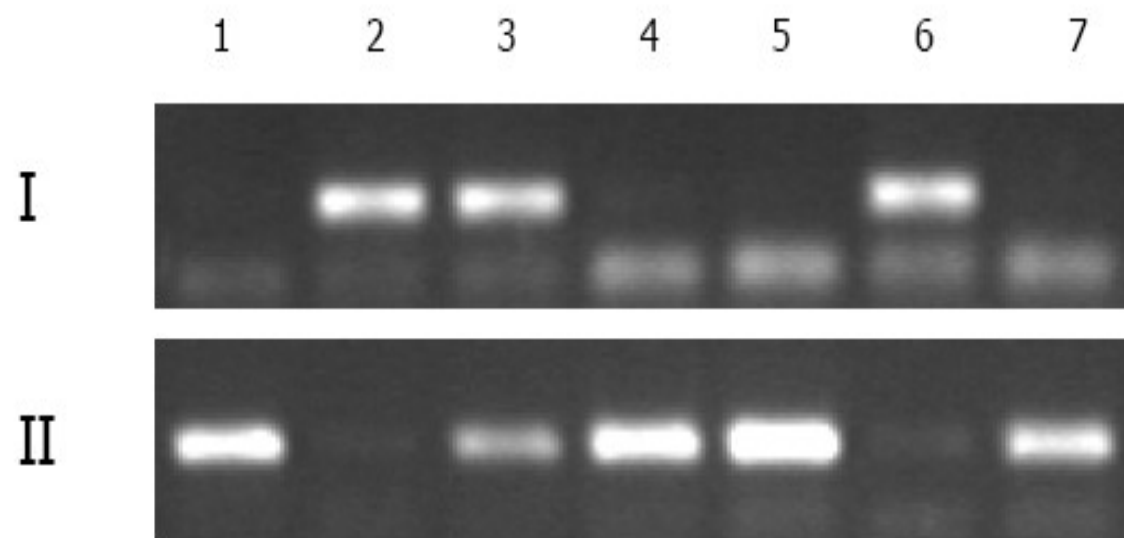
PCR with ASP1 or ASP2 + conserved primer (CON)

Allele 1 DNA



Allele 2 DNA





REAKCJA I	-	+	+	-	-	+	-
REAKCJA II	+	-	+	+	+	-	+
GENOTYP	-/-	Δ/Δ	$\Delta/-$	-/-	-/-	Δ/Δ	-/-

PCR-ASO

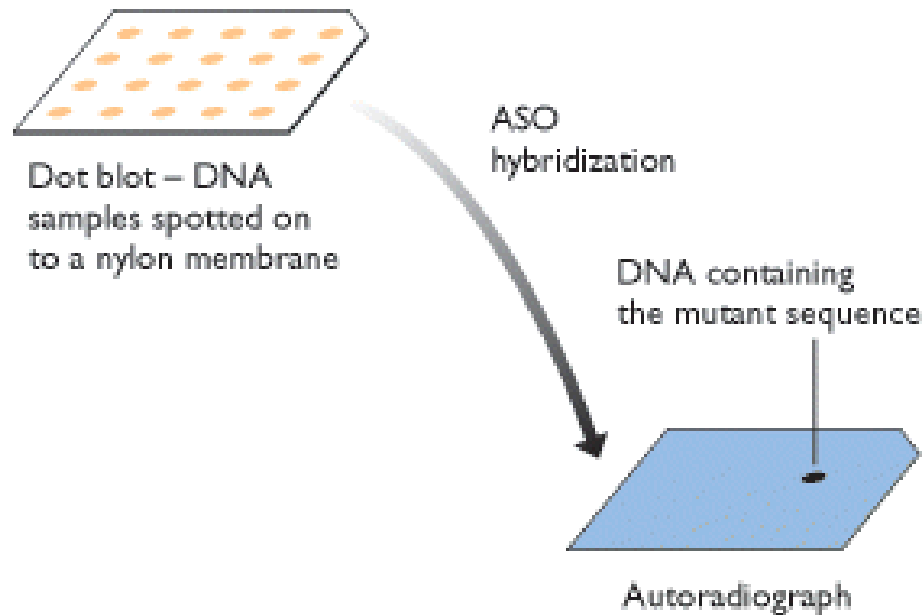
- **Allele specific oligonucleotide** – hybrydyzacja z allelowo-specyficznymi sondami oligonukleotydowymi
- sondy – znakowane oligonukleotydy (fluorescencyjnie, izotopowo)
- dwie **sondy** - jedna komplementarna do **allela dzikiego**, druga do **allela zmutowanego**



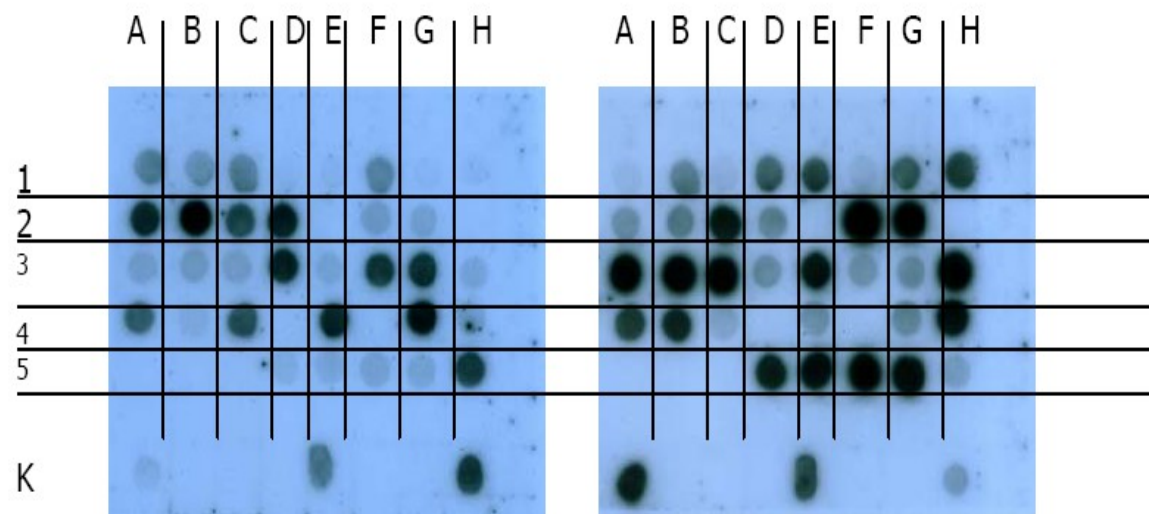
PCR-ASO – etapy:

- 1) **reakcja PCR** – powielenie badanego fragmentu DNA
- 1) **naniesienie** produktu PCR **na membrany** nylonowe
- 1) **naniesienie sond** na membrany
- 1) **hybrydyzacja** sondy-produkt PCR
- 1) **detekcja sygnałów** do shybrydyzowanych sond
– ocena genotypu





SONDA : 35delG 35G 35G



Sekwencjonowanie

sekwencja DNA – kolejność i rodzaj nukleotydów w nici DNA

Sekwencjonowanie - pełna informacja o sekwencji DNA