

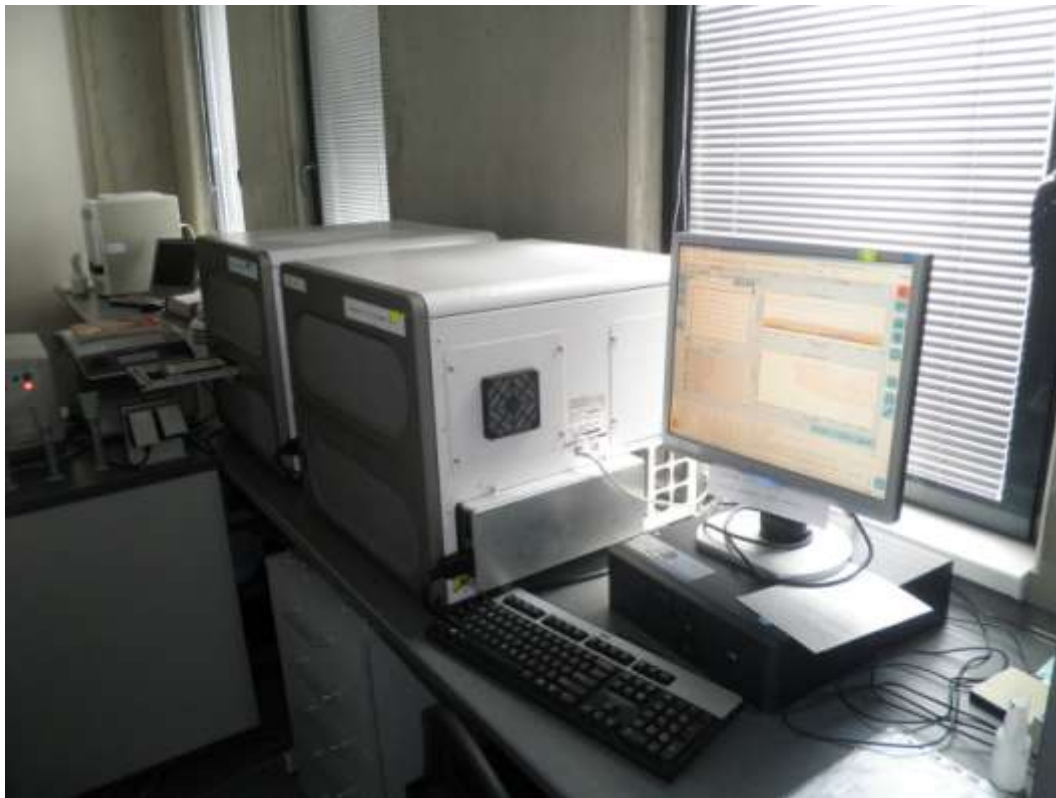
# Metody analýzy RNA

Na Ústavu molekulární a translační medicíny je také oddělení zabývající se analýzou RNA. Pro tuto analýzu jsou k dispozici dva základní nástroje. Prvním nástrojem je real-time PCR, tedy polymerázová řetězová reakce v reálném čase, a druhým je metoda DNA čipu.

Polymerázová řetězová reakce je biochemická metoda sloužící ke zmnožení DNA. Využívá se zde enzym polymeráza z tepelně odolné bakterie. Tato metoda má tři kroky, které musí být pečlivě naplánovány. Prvním krokem je denaturace, kdy se za vysoké teploty okolo 95°C rozpojí dvoušroubovice DNA do jednotlivých řetězců. Ve druhém kroku se sníží teplota na 50 – 60°C tak, aby se mohly připojit krátké úseky DNA, tzv. primery, které určují začátek nového vlákna. V posledním kroku se syntetizuje zbytek DNA pomocí polymerázy při teplotě cca 75°C. Tento cyklus se několikrát opakuje v přístroji umožňujícím rychlé změny teplot zvaném termocykler. Protože tato metoda množí pouze DNA, je nutné zkoumanou RNA převést na DNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy, který je vlastní RNA virům jako je HIV nebo chřipkový virus. Pokud použijeme fluorescenčně značené primery a termocykler se schopností osvětlit vzorek v každém cyklu a snímat fluorescenci, můžeme získat informace o průběhu reakce v reálném čase. Ty geny, které jsou ve vzorku zastoupeny více, se tak budou množit rychleji a intenzivněji než geny zastoupené sporadicky. Tato metoda se v praxi využívá k detekci a kvantifikaci různých mutací, lze ji také použít k detekci cirkulujících nádorových buněk různých typů nádorů, např. plic, střeva, slinivky a prsu. Cirkulující nádorové buňky se mohou stát zárodkem nového nádoru v libovolné vzdálenosti od původního ložiska.

Metoda DNA čipů využívá moderních poznatků a dovedností v oblasti miniaturizace. Původní název je DNA microarray, DNA čip je pojmenování vzniklé z analogie s klasickým čipem, kde je velké množství tranzistorů na malé ploše. U DNA čipu je na malé ploše velké množství krátkých úseků DNA, tzv. prób. Typický průběh DNA čipového experimentu začíná u mediátorové RNA (mRNA), jež slouží k přenosu genetické informace k ribozomům, které na základě této RNA tvoří proteiny. Mediátorová RNA se převede pomocí reverzní transkriptázy na analogické úseky DNA, takzvané cDNA. Tato cDNA se značí fluorescenční značkou a poté se inkubuje s čipem. Tam, kde dojde k navázání úseků cDNA na čip, se po ozáření rozsvítí značka. Při použití více druhů značek lze na jednom čipu analyzovat více vzorků a přímo porovnávat intenzitu záření. Většinou se na jednom čipu analyzují vedle sebe vzorek konkrétního onemocnění, například nádoru, a k tomu korespondující vzorek zdravé tkáně. Analýza genů, které jsou v jednotlivých vzorcích odlišně exprimovány, probíhá pomocí specializovaného softwaru. Ten má v paměti uloženy pozice jednotlivých prób a může tak přiřadit intenzitu signálu ke konkrétním genům. Klinicky lze tuto metodu využít k doplnění standardních genetických vyšetření, např. při detekci vrozených genetických vad.

Obr. 1 Real-time PCR: Zařízení pro Real-time PCR



Obr. 2 Affymetrix: Souprava zařízení pro analýzu na DNA čípech firmy Affymetrix.

