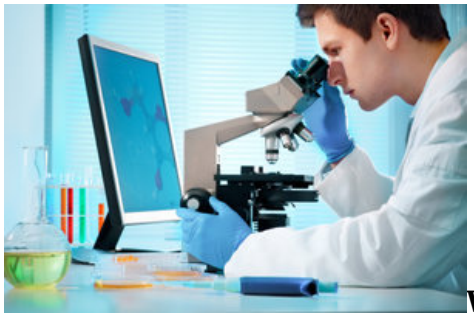
Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

ABC diagnostyki molekularnej

Streszczenie

Rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na rozwinięcie się nowej gałęzi diagnostyki – diagnostyki molekularnej. Diagnostyka molekularna czerpie z najnowszych osiągnięć naukowych oraz technologicznych. Opiera się na analizie kwasów nukleinowych i pozwala zdiagnozować, nie tylko choroby uwarunkowane mutacjami w genach, ale również umożliwia identyfikację mikroorganizmów chorobotwórczych oraz pasożytów. Ponadto badania molekularne są stosowane w określeniu podłoża chorób nowotworowych. Szybki rozwój diagnostyki molekularnej sprawił, że obecnie dostępny jest szereg technik diagnostycznych pozwalających na analizę DNA. Ich dobór zależy od aktualnych potrzeb oraz stopnia znajomości docelowej sekwencji DNA.

Słowa kluczowe: diagnostyka molekularna, PCR, PCR – RLFP, PCR – ASO, PCR – ASA, hybrydyzacja DNA, Southern blot, Northern blot, FISH, mikromacierze DNA, multipleks PCR



Wstęp

Diagnostyka laboratoryjna pełni bardzo istotną rolę w medycynie i stanowi integralną część procesu leczenia. Jedna z definicji diagnostyki laboratoryjnej głosi, że jest ona działem medycyny, który zajmuje się dostarczaniem informacji o stanie zdrowia na podstawie badań materiału biologicznego. Wyniki badań laboratoryjnych są narzędziem pomocnym nie tylko w rozpoznaniu choroby, lecz także pozwalają na prognozowanie rozwoju schorzenia i niejednokrotnie warunkują dobór terapii [5]. Postęp nauki w dziedzinie ogólnie pojętej biologii człowieka sprawił, że techniki stosowane w laboratoriach diagnostycznych stawały się coraz nowocześniejsze i dokładniejsze. Szczególnie ważną rolę w procesach rozwoju metod diagnostycznych miały osiągnięcia w zakresie genetyki zarówno człowieka, jak i organizmów na co dzień z nim związanych. Nieustanny rozwój technik biologii molekularnej oraz wiedzy na temat analizy kwasów nukleinowych sprawiły, że wzrosło zainteresowanie molekularnym podłożem chorób u ludzi. Szereg osiągnięć, do których należą m. in. poznanie struktury DNA przez Watsona i Cricka w roku 1953, odkrycie enzymów restrykcyjnych (1962 rok), które w późniejszym czasie umożliwiły stworzenie metod klonowania DNA, transfer DNA metodą Southerna oraz techniki sekwencjonowania DNA, pozwoliło na poznanie sekwencji nukleotydowej genomu człowieka (2001) [4]. Jednakże największe znaczenie dla rozwoju metod sekwencjonowania wydaje się mieć PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy, polymerase chain reaction), która została opracowana w roku 1983 przez zespół dr Kery'ego Banksa Mullisa [8,11].

Powszechne wprowadzenie metod biologii molekularnej do diagnostyki nastąpiło w pierwszych latach XXI wieku [8]. Obecnie diagnostyka molekularna jest dynamicznie rozwijającą się multidyscyplinarną dziedziną nauki, stanowiącą połączenie diagnostyki medycznej, biologii molekularnej i genetyki. Czerpie ona z najnowszych osiągnięć technologicznych oraz naukowych. Dostępność usług w zakresie diagnostyki molekularnej na polskim rynku z roku na rok jest coraz większa, a jej koszty maleją. Instytuty badawcze, oferujące tego typu usługi, znajdują się właściwie w każdym mieście wojewódzkim, a badania molekularne stanowią część standardowej praktyki diagnostycznej, dzięki czemu możliwe jest wczesne wykrycie niebezpiecznych chorób oraz wczesne rozpoczęcie działań profilaktycznych [12]. Metody oparte na analizie kwasów nukleinowych znalazły obecnie szerokie zastosowanie zarówno w diagnostyce chorób genetycznych, czy nowotworowych, jak również infekcyjnych i pasożytniczych. Ponadto dają możliwości określenia stopnia zgodności genetycznej tkanek oraz pokrewieństwa osób [1].

Diagnostykę molekularną można podzielić na dwa typy: diagnostykę bezpośrednią i pośrednią. Diagnostyka bezpośrednia polega na poszukiwaniu mutacji w zidentyfikowanych genach, natomiast pośrednia stosowana jest rzadziej, kiedy gen odpowiedzialny za chorobę jest nieznany, a oparta jest o analizę asocjacji bądź sprzężeń [8].

Zasadniczo wyróżnia się dwa typy metod stosowanych w diagnostyce molekularnej: metody oparte o hybrydyzację oraz metody oparte o amplifikację DNA [2,8].

Metody diagnostyczne oparte o PCR

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR – polymerase chain reaction) została opracowana w roku 1983 przez Mullisa i wsp. Umożliwia ona szybką, trwającą zaledwie kilka godzin, syntezę miliardów kopii dowolnego fragmentu genomowego DNA [11,14]. PCR polega na powielaniu in vitro fragmentów kwasów nukleinowych i pozwala na amplifikację specyficznej, wybranej do badań sekwencji, która następnie może posłużyć analizy i manipulacji [8]. W skład mieszaniny reakcyjnej do PCR wchodzą cztery składniki:

1. matrycę – fragment DNA, który ma być powielony;
2. startery – oligonukleotydowe fragmenty DNA, komplementarne do sekwencji flankujących docelowy fragment DNA;
3. trójfosforany deoksynukleotydów (dNTP) – dATP, dTTP, dGTP i dCTP, substraty, niezbędne do syntezy nici komplementarnej;
4. termostabilną polimerazę DNA [8,14].

Łańcuchowa reakcja polimerazy składa się z trzech powtarzanych cyklicznie etapów (ok. 30 – 40 cykli), które muszą przebiegać w odpowiedniej dla siebie temperaturze: denaturacji DNA (90 – 95oC, zależnie od długości matrycy), przyłączenia starterów (45 – 70oC, zależnie od długości i składu zasad starterów) oraz syntezy nici DNA (do ok. 72oC). Dla każdego z etapów odpowiednią temperaturę trzeba ustalić doświadczalnie, jej utrzymanie i cykliczne zmiany umożliwia zastosowanie termocyklera. Zdecydowanymi zaletami tej metody są wysoka czułość, mała ilość DNA matrycowego wymagana do reakcji (poniżej 1 µg), specyficzność i szybkość [8,14]. Ponadto, w przeciwieństwie do innych metod analizy, jak np. metoda Southerna, PCR może być poddany materiał genetyczny nawet w znacznym stopniu zdegradowany. Dzięki temu możliwe jest badanie śladowych ilości krwi, komórek hodowanych in vitro, śliny, moczu, próbek pobranych w trakcie biopsji cienkoigłowej, czy skrawków histopatologicznych utrwalonych i zatopionych w parafinie [2]. Warto również wspomnieć, że metody, wykorzystujące PCR charakteryzują się większą czułością i specyficznością, a ponadto oszczędzają czas i zmniejszają koszty analizy. Jednakże pewnym ograniczeniem jest konieczność znajomości sekwencji okalających docelowy fragment DNA, gdyż technika wymaga stosowania starterów do nich komplementarnych [8]. Klasycznym przykładem zastosowania PCR jest wykrywanie patogenów przed pojawieniem się objawów chorobowych, ponadto w tym przypadku PCR wykazuje 100 większą czułość niż metody hybrydyzacyjne [2].

Do najprostszych wariantów PCR należy multipleks – PCR. Metoda ta umożliwia prowadzenie amplifikacji kilku fragmentów DNA (genów, eksonów) w jednym czasie, za sprawą zastosowania kilku par swoistych starterów oraz większej ilości polimerazy oraz dNTP [2,8]. Multipleks – PCR jest często wykorzystywana do wykrywania delecji eksonów w genach, powodujących występowanie jednogenowych chorób dziedzicznych, jak np. w dystrofii mięśniowej Duchenne'a [8]. Ponadto, dzięki możliwości stwierdzenia obecności kilku patogenów jednocześnie, pozwala przyspieszyć diagnostykę chorób bakteryjnych bądź wirusowych, zmniejszyć ilość pobieranego materiału oraz ograniczyć koszty [3].

Modyfikacje łańcuchowej reakcji polimerazy takie jak PCR – ASA (amplifikacja allelospecyficzna, allele specific amplification) i PCR – ASO (sonda allelospecyficzna, allele specific oligonucleotide) są metodami umożliwiającymi rozróżnienie w danym genie alleli prawidłowych oraz zmutowanych. Są to przykłady technik diagnostyki bezpośredniej i wymagają znajomości badanej mutacji [8]. PCR – ASA polega na zastosowaniu dwóch par starterów, dla allelu prawidłowego i zawierającego mutację, tak by produkty reakcji różniły się długością. Rozdzielenie produktów w żelu agarozowym pozwala określić, czy allel badanego genu jest prawidłowy czy nie. W przypadku heterozygoty wykrywane są oba allele. Metoda ta wykorzystywana jest m. in. w diagnostyce mutacji 5382insC w genie BRCA1,

skorelowanej z występowaniem raka piersi lub jajników u kobiet. W tym przypadku diagnoza podłoża zachorowania ma bardzo istotne znaczenie z punktu widzenia leczenia [16,17]. PCR – ASO, natomiast, jest techniką wiążącą amplifikację z hybrydyzacją. Produkt powstały w PCR poddawany jest hybrydyzacji z dwoma syntetycznymi sondami molekularnymi – jedną specyficzną dla prawidłowego genu, drugą dla genu niosącego mutację. Analiza sygnałów pochodzących z hybrydyzacji pozwala stwierdzić obecność, bądź brak mutacji odpowiedzialnej za wystąpienie choroby. PCR – ASO stosowana jest m. in. w analizie genu CFTR u chorych na mukowiscydozę [8].

Inną szeroko stosowaną techniką, łączącą amplifikacje z analizą restrykcyjną, jest PCR – RFLP (polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, restriction fragment length polymorphism). Metoda RFLP jest powszechnie stosowana w biologii molekularnej. Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych jest wynikiem powstania dodatkowego miejsca ciecia dla konkretnych enzymów restrykcyjnych bądź utraty dotąd istniejącego. Analiza, zamplifikowango i poddanego cięciu restrykcyjnemu, materiału genetycznego odbywa się dzięki elektroforezie w żelu agarozowym lub poliakrylamidowym. Detekcja dwóch prążków o określonej długości w żelu świadczy o obecności danego miejsca restrykcyjnego, natomiast jednego – o jego zaniku. PCR – RFLP jest jedną z najprostszych metod detekcji mutacji punktowych w jednogenowych chorobach dziedzicznych, stosowana jest w diagnozowaniu m. in. mukowiscydozy, fenyloketonurii, anemii sierpowatej i hemofilii [8]. Techniką tą można również różnicować mikroorganizmy na poziomie gatunków i podgatunków, np. Pseudomonas aeruginosa (zakażenia u ludzi z obniżoną odpornością), Listeria (listerioza), Borrelia (borelioza), Campylobacter (zakażenia przewodu pokarmowego), czy Acinetbacter (różnego typu zakażenia szpitalne). PCR – RFLP pozwala również na rozróżnienie poszczególnych szczepów jednego gatunku w badaniach epidemiologicznych. W diagnostyce chorób bakteryjnych duże znaczenie ma odmiana PCR – RFLP zwana rybotypowaniem, umożliwiająca analizę genów kodujących rybosomalne RNA (rRNA – ribosomal RNA) [7].

Odkrycie, że punktowa zmiana w sekwencji DNA zmienia konformację przestrzenną pojedynczej nici DNA zaowocowało opracowaniem techniki PCR – SSCP (polimorfizm konformacji pojedynczej nici, single strand conformation polymorphism). PCR – SSCP bazuje na odmiennym sposobie poruszania się w trakcie elektroforezy cząsteczek DNA o różnej strukturze przestrzennej i cieszy się duża popularnością, jako metoda przesiewowa, pozwalająca na wykrycie nieznanych mutacji w znanych genach. Podobne założenia ma technika analizy heterodupleksów (HA – heteroduplex analysis), która pozwala na identyfikację zmutowanego genu, dzięki różnicom w sposobie poruszania heterodupleksów (dwuniciowa cząsteczka DNA nie w pełni komplementarna) w stosunku do homodupleksów (dwuniciowa cząsteczka DNA w pełni komplementarna) [8].

Do technik przesiewowych, umożliwiających wstępne wykrycie zmian w materiale genetycznym należy elektroforeza w gradiencie denaturującym (DGGE – denaturing gradient gel electrophoresis). Metoda ta oparta jest na różnej zdolności, zależnej od długości i składu zasad, produktów PCR do denaturacji w określonej temperaturze i stężeniu czynnika denaturującego (mocznik, formamid). W trakcie rozdziału elektroforetycznego prowadzonego w żelu o wzrastającym stężenie substancji denaturującej fragmenty DNA zawierające mutacje denaturują w innym momencie niż fragmenty o prawidłowej sekwencji. Denaturacja powoduje gwałtowne zmniejszenie prędkości migracji danego fragmenty DNA. Dzięki temu można zaobserwować mutację bądź polimorfizm u danego pacjenta w porównaniu do analogicznych fragmentów genów osób należących do grupy kontrolnej [13].

Prócz przytoczonych powyżej metod, w diagnostyce stosowanych jest również wiele modyfikacji PCR zależnie od potrzeb analizy, należą do nich m. in.:

- RT – PCR (reverse transcriptase – PCR), gdzie matrycą wyjściową jest RNA, przepisywany w procesie odwrotnej transkrypcji na komplementarny DNA (cDNA – complementary DNA), który to

w kolejnych etapach ulega amplifikacji w PCR;

- nested – PCR (gniazdowa lub zagnieżdżona PCR), polegająca na przeprowadzeniu dwóch cykli amplifikacji – jednego ze standardowymi starterami i drugiego ze starterami komplementarnymi do sekwencji znajdujących się wewnątrz docelowego fragmentu DNA, pozwala ona na większą specyficzność reakcji;

- RAPD (random amplified polymorphism DNA), stosowana w przypadku, gdy sekwencje specyficzne nie są znane, polega na zastosowaniu starterów uniwersalnych, pozwalających na uzyskanie zbioru produktów;

- RACE (rapid amplification of cDNA ends), umożliwiająca otrzymanie pełnej długości sekwencji, gdy znane są jedynie fragmenty;

- Real – time PCR (PCR w czasie rzeczywistym, również oznaczana, jako RT – PCR), należy do metod ilościowych, jej główną zaletą jest możliwość obserwacji przyrostu produktu na bieżąco, w czasie przebiegu reakcji [6,14].

Metody diagnostyczne oparte o hybrydyzację

Hybrydyzacja jest techniką pozwalającą na identyfikację i lokalizację określonych sekwencji nukleotydowych w docelowym DNA. Istotą tego procesu jest zdolność kwasów nukleinowych do tworzenia stabilnych dwuniciowych struktur pomiędzy dwoma komplementarnymi jednoniciowymi fragmentami [2,8].

Proces hybrydyzacji przebiega w kilku podstawowych etapach:

1. izolacja badanego DNA;
2. rozdzielenie badanego DNA w żelu elektroforetycznym;
3. denaturacja badanego DNA w środowisku alkalicznym;
4. przeniesienie i unieruchomienie badanego DNA na filtrze nylonowym lub nitrocelulozowym;
5. hybrydyzacja badanego DNA z wyznakowaną sondą molekularną;
6. wypłukanie niezwiązanych fragmentów sondy;
7. detekcja powstałych dupleksów, zależnie od sposobu wyznakowania sondy, poprzez autoradiografię (znakowanie radioaktywne), reakcje immunochemiczne, kolorymetrię lub chemiluminescencję (znakowanie nieradioaktywne) [8].

Najprostszą metodą hybrydyzacji jest technika „dot – blot”. Polega ona na unieruchomieniu na filtrze całkowitego wyizolowanego z komórek DNA lub RNA i poddaniu go hybrydyzacji z sondą molekularną o określonej sekwencji. Wynik otrzymywany jest w postaci „plam” na filtrze podczas detekcji. Sygnał świadczy o rozpoznaniu przez sondę poszukiwanej sekwencji nukleotydowej. Jednakże metoda ta jest rzadko stosowana z diagnostyce ze względu na swoją niewystarczającą czułość [2,6].

Jedną z bardziej skomplikowanych technik opartych o hybrydyzację z sondą, stosowaną w diagnostyce chorób jednogenowych i chorób zakaźnych, jest hybrydyzacja typu Southern blot, inaczej zwana metodą Southerna. Została ona opracowana przez Eda Southerna w 1975 roku. Istotą tej metody jest hybrydyzacja DNA – DNA, a jej celem jest identyfikacja poszukiwanych sekwencji w mieszaninie otrzymanej w wyniku trawienia enzymami restrykcyjnymi. Całość procedury przebiega właściwie zgodnie z podanym wcześniej schematem. DNA izolowane jest z komórek, następnie cięte odpowiednią restryktazą i poddawane elektroforezie w żelu agarozowym. Rozdział

elektroforetyczny umożliwia określenie długości analizowanych fragmentów. Zdenaturowane fragmenty restrykcyjne unieruchamiane są na filtrze i podlegają hybrydyzacji z sondą o określonej sekwencji nukleotydowej. Po usunięciu niezwiązanej sondy można przeprowadzić detekcję powstałych hybrydów [8].

Ten typ hybrydyzacji pozwala na wykrycie mutacji o charakterze delecji lub insercji większych niż 50 – 100 pz. Ponadto metodą tą można zidentyfikować mutacje punktowe, powodujące powstanie dodatkowego miejsca cięcia dla enzymów restrykcyjnych, bądź utratę dotąd istniejącego [8].

Hybrydyzacja typu Northern (Northern blot) pozwala na badanie poziomu ekspresji badanego genu. Opiera się na tworzeniu hybrydów RNA – DNA, a jej nazwa powstała przez analogię do metody Southerna. Od poprzedniej metody różni się tym, że izolacja dotyczy informacyjnego RNA (mRNA – messenger ribonucleic acid), stanowiącego transkrypt genów aktywnych w danym typie komórek. W przypadku mRNA nie ma konieczności cięcia enzymatycznego, zatem fragmenty kwasów nukleinowych poddawane są bezpośrednio elektroforezie i denaturacji, a następnie przenoszone na filtr. mRNA poddawane jest hybrydyzacji z wyznakowaną sondą DNA, a hybrydy RNA – DNA wykrywa się zależnie od sposobu znakowania sondy. Metodę tę wykorzystuję się w celu uzyskania informacji na temat zmiany wielkości transkryptów oraz poziomu ekspresji badanych genów [8].

Metody Southern i Northern blot znalazły swoje zastosowanie nie tylko w diagnostyce chorób uwarunkowanych mutacjami w genach, ale również w diagnostyce chorób zakaźnych. Pozwalają one na wykrycie obcych kwasów nukleinowych w organizmie, umożliwiając jednocześnie określenie ilości patogennych łańcuchów DNA lub RNA w komórkach. W tym celu należy jednak dysponować oligonukleotydami o dokładnie znanej sekwencji znajdującej się w materiale genetycznym patogenu, którego obecność ma być potwierdzona lub wykluczona [2].

Jednym z najnowszych osiągnięć biologii molekularnej są tzw. mikromacierze DNA (DNA microarray). Mikromacierz stanowi uporządkowany układ sond molekularnych unieruchomionych na nylonowych membranach albo płytkach szklanych bądź plastikowych. Podstawą tej techniki jest przygotowanie sond, w postaci jednoniciowego DNA lub oligonukleotydów reprezentujących fragmenty genów, i stabilne związanie ich z powierzchnią membrany lub płytki w określonej kolejności. Przeznaczony do analizy DNA należy wyznakować i poddać hybrydyzacji z sondami. Uzyskane podczas detekcji dane poddawane są analizie z zastosowaniem systemów informatycznych. Technika ta jest stosowana m. in. do identyfikacji sekwencji oraz badania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów [8].

Techniki cytogenetyki molekularnej wykorzystywane w diagnostyce

Diagnostyka cytogenetyczna umożliwia wykrywanie delecji lub duplikacji fragmentów genów większych niż 1 kpz, szczególnie tych obejmujących całe eksony, których ujawnienie nie jest możliwe z zastosowaniem PCR lub sekwencjonowania. Aberracje te są przyczyną wielu chorób o podłożu genetycznym i stanowią ok. 5,5 % patogennych zmian w genomie [10].

Klasyczne techniki cytogenetyczne polegają na analizie obrazu prążkowego chromosomów, uzyskiwanego za pomocą specyficznego barwienia. Każda z par chromosomów posiada charakterystyczny dla siebie układ prążków. Liczba prążków uzyskanych podczas barwienia odpowiada za czułość badania a w konsekwencji za wielkość rozpoznawanych aberracji chromosomowych. Standardowe badanie cytogenetyczne pozwala na uzyskanie 450 – 550 prążków w haploidalnym zestawie chromosomów, co daje możliwość rozpoznania zmian nie mniejszych niż 5 Mpz. Techniki o wysokiej rozdzielczości (HRT – high resolution techniques) pozwalają na uzyskanie 550 – 850 prążków, umożliwiając rozpoznanie rearanżacji o wielkości ok. 3 Mpz [15]. Ponadto, dzięki

analizie kariotypu można wykryć zmiany w liczebności chromosomów, a co za tym idzie uzyskać wczesną diagnozę aneuploidii chromosomów 13 (zespół Platau'a), 18 (zespół Edwardsa), 21 (zespół Downa), czy chromosomów płci (np. zespół Turnera). Jednakże badanie przeprowadzone metodami klasycznymi wymaga założenia kolonii komórkowych (tzw. amniocytów), a na wynik trzeba czekać ok. 10 – 21 dni [9].

Rozwój biologii molekularnej oraz molekularnych metod diagnostycznych, pozwoliły na wyodrębnienie się w latach 80 – tych XX wieku nowej gałęzi cytogenetyki klinicznej - cytogenetyki molekularnej. Cytogenetyka molekularna wykorzystuje osiągnięcia, takie jak klonowanie i automatyczne powielanie fragmentów DNA. Takie fragmenty mogą posłużyć, jako sonda molekularna do konkretnych części chromosomów w technice fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH – fluorescence in situ hybridization) [15]. FISH tym się różni od wcześniej opisanych metod diagnostycznych opartych o hybrydyzację, że stosuje się ją do analizy sekwencji w nienaruszonych komórkach. Hybrydyzacja in situ wykonywana jest bezpośrednio na preparacie mikroskopowym, jest szeroko stosowana do detekcji określonych sekwencji na preparatach histologicznych, chromosomach, pojedynczych komórkach, a nawet skrawkach tkanek [8]. W technice tej stosuje się sondy zależne od problemu diagnostycznego, są to sondy locus – specyficzne, centromerowe lub malujące. FISH znajduje zastosowanie w przypadkach klinicznego podejrzenia określonego zespołu genetycznego, wywołanego aberracjami chromosomowymi, takimi jak mikrodelecje i mikroduplikacje, niemożliwymi do wykrycia metodami klasycznymi. Do chorób identyfikowanych ta techniką należą m. in. zespół Williamsa, zespół kociego krzyku i zespół Beckwitha – Wiedemanna [15]. Metoda ta nieustannie jest doskonalona, jej odmiana tzw. Rapid – FISH (szybka fluorescencyjna hybrydyzacja in situ) wykorzystywana jest w diagnostyce prenatalnej aneuploidii chromosomów 13, 18, 21, X i Y. Ma ona wiele zalet w porównaniu z klasycznymi metodami cytogenetycznymi, m. in. skrócenie czasu oczekiwania na wynik do 2 – 5 dni oraz pobieranie ok. 10 razy mniejszej ilości płynu owodniowego (1 – 2 ml) [9]. Ponadto opracowane zostały takie warunki, że FISH może być z powodzeniem stosowana do detekcji patogenów infekcyjnych w komórkach [2].

FISH ma jednak sporo ograniczeń, do których należy czułość w granicach 40 – 250 kpz dla jąder interfazowych oraz wybór sondy do badania zależny od rozpoznania lekarza [10]. Obecnie FISH wypierana jest przez nowocześniejsze metody z zakresu cytogenetyki molekularnej, do których należą multipleksowa amplifikacja sondy zależna od ligacji (MLPA – multiplex ligation – dependent probe amplification) oraz porównawcza hybrydyzacja genomowa (CGH – comparative genomic hybridization).

MLPA powstała w roku 2002, została opracowana przez firmę MRC Holland. Technika ta oparta jest na ligacji i PCR. MLPA umożliwia wykrycie delecji i duplikacji pojedynczych eksonów, badanie poziomu mRNA, ocenę poziomu metylacji badanych fragmentów (MS – MLPA, metylation specific – MLPA), a nawet wykrycie zmian pojedynczych nukleotydów. Obecnie stosuje się ją głównie w celu identyfikacji aberracji subtelomerowych (tzn. w obrębie końców chromosomów) oraz znanych zespołów mikrodelecyjnych. Niewątpliwymi zaletami tej techniki są niewielka ilość DNA potrzebna do analizy oraz stosunkowo niska cena, ponadto wymaga mniej czasu niż FISH. MLPA może z powodzeniem zastąpić FISH w diagnostyce chorób takich jak zespół Williamsa, DiGeorge'a, Sotosa lub Millera – Diekera, a dzięki zastosowaniu MS – MLPA można analizować stan metylacji w rejonach krytycznych dla zespołu Pradera – Williego i Angelmana. Warto również podkreślić, że MLPA umożliwia badanie w kierunku wielu możliwych aberracji chromosomowych równocześnie [10,15].

Jednakże obie wcześniej opisane metody wymagają wcześniejszego rozpoznania klinicznego konkretnego zespołu genetycznego (MLPA w mniejszym stopniu). Przełomem w diagnostyce chorób uwarunkowanych aberracjami chromosomowymi stała się technika CGH. CGH polega na hybrydyzacji dwóch wyznakowanych fluorescencyjnie genomowych DNA, badanego i referencyjnego,

zmieszanych w proporcji 1:1, do prawidłowych chromosomów metafazowych. Technika ta ma przewagę nad dotychczas znanymi metodami diagnostyki wad genetycznych, dzięki możliwości ich identyfikacji bez wcześniejszego podejrzenia ich występowania. Umożliwia ona przeszukiwanie całego genomu w jednym badaniu, a czas oczekiwania na wyniki nie przekracza kilku dni [10,15]. Ponadto w przypadku CGH do mikromacierzy (aCGH – arrayCGH) uzyskano rozdzielczość sięgająca kilkuset a nawet, w niektórych przypadkach, kilku – kilkunastu par zasad. Metoda aCGH pozwala na jednoczesną identyfikację aneuploidii, duplikacji, delecji oraz amplifikacji każdego reprezentowanego na mikromacierzy locus genowego. Jest ona wykorzystywana głównie w diagnostyce chorych z niepełnosprawnością intelektualna, wadami rozwojowymi i dysmorfią [15]. Jednakże i ta technika ma pewne ograniczenia. Nie można, dzięki temu badaniu, wykryć translokacji oraz inwersji w obrębie genomu, jak również wymaga zastosowania specjalistycznego sprzętu, wysoko wykwalifikowanego personelu oraz dużych nakładów finansowych [10,15].

Podsumowanie

Istotą diagnostyki molekularnej jest analiza kwasów nukleinowych w celu zidentyfikowania podłoża danej choroby bądź predyspozycji do zachorowania. W naturalny sposób dotyczy ona chorób dziedzicznych, których diagnoza wcześniej opierała się na obserwacji objawach i, w przypadku chorób metabolicznych, analizach biochemicznych. Diagnostyka molekularna stała się nieocenionym narzędziem w wykrywaniu chorób uwarunkowanych mutacjami w DNA.

Poza tak oczywistym zastosowaniem, jak detekcja mutacji w DNA pacjentów, metody diagnostyki molekularnej znalazły swoje zastosowanie w identyfikacji chorób zakaźnych i badaniach epidemiologicznych. Dzięki temu, że materiał genetyczny jest unikalny i stały dla każdego organizmu, opisane techniki pozwalają na wykrycie obcego DNA lub RNA oraz jego identyfikację. Zastosowanie analizy molekularnej pozwala na ograniczenie ilości analizowanego materiału biologicznego oraz wiele szybsze niż w metodach konwencjonalnych wykrycie patogenu, który jest odpowiedzialny za rozwój choroby i rozpoczęcie leczenia. Szczególne znaczenie mają one dla mikroorganizmów, których hodowla w warunkach laboratoryjnych jest trudna bądź wręcz niemożliwa. Diagnostyka molekularna stosowana jest również w parazytologii. Wykrycie DNA pasożyta jest bezpośrednim dowodem na jego obecność w organizmie. Ponadto, metody molekularne wykazują bardzo dużą czułość i mają wiele zalet w stosunku do metod klasycznych opartych na morfologii lub serologii. Techniki biologii molekularnej mają istotne znaczenie również w diagnostyce nowotworów. Etiologia nowotworów ma, bowiem, decydujące znaczenie w doborze metod leczenia.

Dobór metody diagnostycznej zależy od potrzeb oraz stopnia znajomości sekwencji badanych genów ludzkich lub materiału genetycznego patogenów. Analiza, w większości przypadków, rozpoczyna się od izolacji DNA, a badanie przebiega bądź z zastosowaniem metod hybrydyzacyjnych bądź modyfikacji techniki PCR. Metody, wykorzystujące PCR charakteryzują się większą czułością i specyficznością, a ponadto oszczędzają czas i zmniejszają koszty analizy. Jednakże bywa i tak, że trzeba połączyć oba sposoby analizy kwasów nukleinowych. Ma to miejsce np. przy oznaczaniu Chlamydia trachomatis, a badanie obejmuje analizę hybrydyzacyjną rRNA oraz wykrywanie z zastosowaniem PCR plazmidu specyficznego dla tej bakterii.

Autor: Magdalena Maniecka

Literatura:

1. Bal J. 2001. Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 11-14
2. Bartkowiak J. 2003. Badania molekularne w rozpoznawaniu i różnicowaniu chorób zakaźnych.

Przegląd Epidemiologiczny 57:381-389
3. Bednarska A, Podlasin R, Karczewski G, Łoch T, Horban A and Radkowski M. 2005. Ocena użyteczności metody multiplex PCR w diagnostyce zmian w ośrodkowym układzie nerwowym pacjentów zakażonych HIV i chorych na AIDS. Przegląd Epidemiologiczny 59:873-879
4. Gabryelska MM, Szymański M and Barciszewski J. 2009. DNA – cząsteczka, która zmieniła naukę. Krótka historia odkryć. Nauka 2:111-134
5. http://www.and.org.pl/index.php?option=com_content&task=view&id=85&Itemid=70
6. Kozak – Cięszczyk M. 2005. Diagnostyka molekularna w parazytologii. Kosmos 54:49-60
7. Krawczyk B. 2007. Diagnostyka molekularna z zakażeniach szpitalnych. Postępy Mikrobiologii 46:367-378
8. Liczbańska A, Woźniak A, Wawrocka A and Krawczyński MR. 2006. Techniki wykorzystywane w diagnostyce molekularnej chorób jednogenowych. Nowiny Lekarskie 75:486-490
9. Łaczmańska I, Stembalska A, Ślęzak R, Kozłowska J, Makowska I, Czemarmazowicz H, Pesz KA, Śmigiel R, Jakiel A and Sąsiadek MM. 2007. Rapid – FISH jako szybka metoda wykrywania najczęstszych liczbowych aberracji chromosomowych w diagnostyce prenatalnej u kobiet z grupy wysokiego ryzyka. Ginekologia Polska 78:952-955
10. Łaczmańska I and Łaczmański L. 2009. Metoda MLPA oraz jej zastosowanie w diagnostyce chorób uwarunkowanych genetycznie. Postępy Biologii Komórki 36:555-563
11. Mullis KB. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American 4:56-61
12. Słota M, Stępień G and Ziemski M. Diagnostyka molekularna – zastosowanie technik biologii molekularnej w identyfikacji chorób genetycznych i nowotworowych. http://frk.pl/biotechmed/2011/junior/junior_13.pdf
13. Struniawski R, Szpechciński A and Chorostowska – Winimko J. 2008. Diagnostyka molekularna niedoboru alfa – 1 – antytrypsyny w praktyce klinicznej. Pneumonologia i Alergologia Polska 76:253-264
14. Studzińska A, Tyburski J, Daca P and Tretyn A. 2008. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. Biotechnologia 80:71-85
15. Szczałuba K, Obersztyn E and Mazurczak T. 2010. Zastosowanie nowoczesnych technik cytogenetyki molekularnej w diagnostyce wrodzonych wad rozwojowych. Perinatologia, Neonatologia i Ginekologia 3:108-116
16. Utracka – Hutka B, Lange D, Nowicka E, Grzybowska E, Ziętek H, Rogodzińska – Szczepka J, Behrendt K and Suwiński R. 2003. Kliniczny przebieg raka piersi u nosicielek germinalnych mutacji w genie BRCA1. Współczesna Onkologia 7:742-753
17. www.molekularna.pl

https://laboratoria.net/artykul/12831.html

Informacje dnia: Rusza 15. edycja konkursu Złoty Medal Chemii Behawiorystka: żyć jak kot z kotem, czyli źle Proteza stawu biodrowego z pomocą robota Szkic rozporządzenia o ewaluacji nauki będzie gotowy późną jesienią Wystarczył jeden gen, aby przenieść zachowanie między gatunkami Napoje izotoniczne Rusza 15. edycja konkursu Złoty Medal Chemii Behawiorystka: żyć jak kot z kotem, czyli źle Proteza stawu biodrowego z pomocą robota Szkic rozporządzenia o ewaluacji nauki będzie gotowy późną jesienią Wystarczył jeden gen, aby przenieść zachowanie między gatunkami Napoje izotoniczne Rusza 15. edycja konkursu Złoty Medal Chemii Behawiorystka: żyć jak kot z kotem, czyli źle Proteza stawu biodrowego z pomocą robota Szkic rozporządzenia o ewaluacji nauki będzie gotowy późną jesienią Wystarczył jeden gen, aby przenieść zachowanie między gatunkami Napoje izotoniczne

Partnerzy