

IV107 Bioinformatika I

Přednáška 3

Katedra informačních technologií
Masarykova Univerzita Brno

Jaro 2012



Před týdnem

DNA nepřímo (přes proteiny) řídí většinu procesů v buňce. Její struktura vykazuje všechny potřebné rysy. Je nositelem genů.

Exprese genů

- ▶ transkripce
- ▶ translace

Struktura proteinů

- ▶ primární (sekvence aminokyselin)
- ▶ sekundární (α , β , etc.)
- ▶ terciární (3-D)
- ▶ kvartérní (makromolekulární komplexy)



[Hemoglobin](#) Chime

An introductory presentation suitable for lectures or individual study.

[\(Deutsch, Português\)](#)



[DNA Structure](#) Chime

An introductory level, nonlinear self-paced tutorial. [\(Deutsch, Español, Português\)](#)

'Win-IE6-Compatible'



[Antibody](#) Chime

An introductory presentation suitable for lectures or individual study.

[\(Deutsch\)](#)



[MHC](#) Chime

The Major Histocompatibility Complex presents peptides from foreign proteins to T lymphocytes, crucial to disease immunity.



[Lipid Bilayers and Membrane Channel](#) Chime

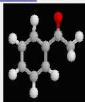
Introduces cholesterol and phospholipids, then proceeds to lipid bilayer and the gramicidin membrane channel embedded within the bilayer. Includes molecular dynamics simulations of both gel and fluid membrane states. By Eric Martz and Angel Herráez. [\(Español\)](#)



[Molecular Vibrations: IR Spectrum](#) Chime

by Mołjka, Lahti & Lancashire.

'Win-IE6-Compatible'



[Water](#) Chime

Theoretical simulation of 10 water molecules condensing into a hydrogen-bonded droplet. Includes challenge questions for students.

'Win-IE6-Compatible'



[Lac repressor](#) Chime

bending the DNA operon as it goes from nonspecific to specific DNA binding.

'Win-IE6-Compatible'



[Bacterial Flagellar Hook](#) Chime

Bacterial flagella are whip-like organelles that bacteria use to swim about. The hook acts as a molecular universal joint. It's composed of over 100 protein subunits.

'Win-IE6-Compatible'

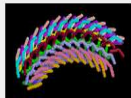


Schéma 1

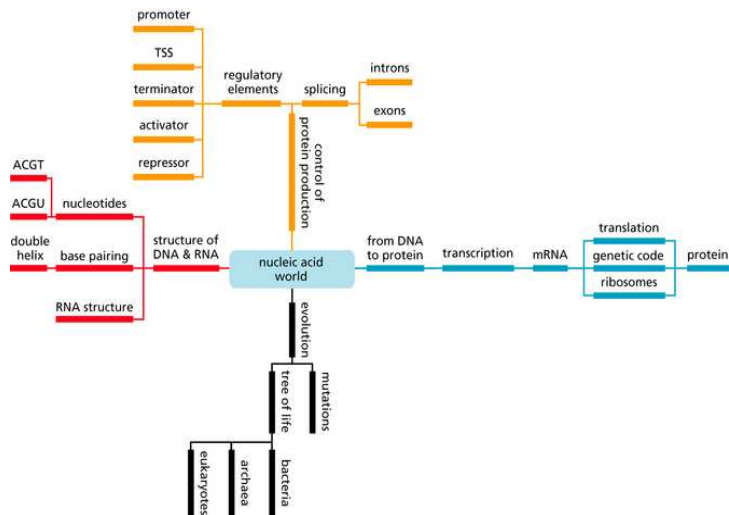
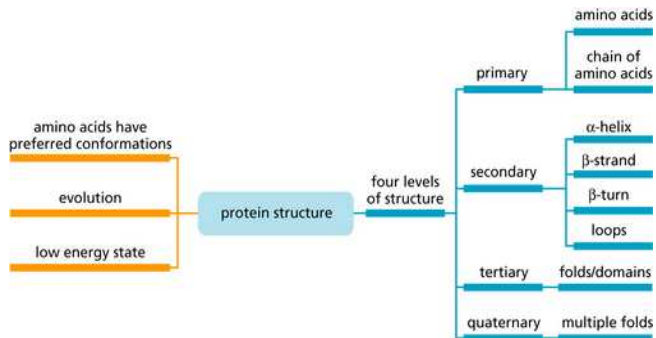


Schéma 2



Outline

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Analýza sekvencí



Techniky manipulující DNA a RNA

- ▶ Rekombinace DNA a klonování
 - ▶ izolace z buněk
 - ▶ štěpení restričními endonukleázami
 - ▶ rekombinace (ligace)
 - ▶ transformace organismů rekombinantní DNA
- ▶ Syntéza, kopírování a amplifikace DNA
 - ▶ syntéza oligonukleotidů
 - ▶ transkripce in vitro
 - ▶ syntéza cDNA
 - ▶ amplifikace pomocí PCR
- ▶ Detekce, analýza a sekvenace
 - ▶ elektroforéza (dělení podle velikosti)
 - ▶ hybridizace se značenými sondami
 - ▶ určování sekvence

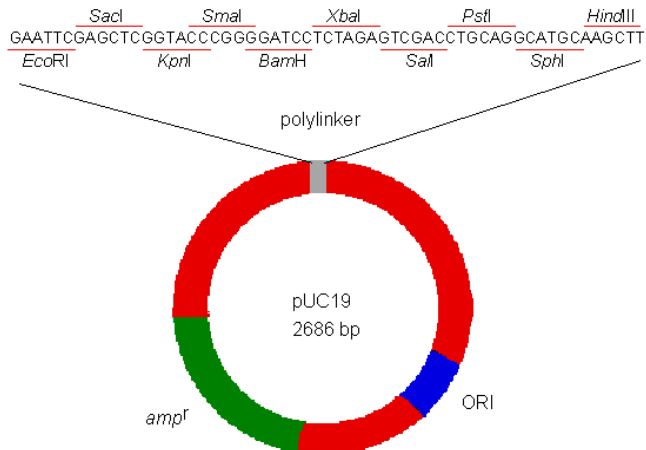


Restrikční endonukleázy

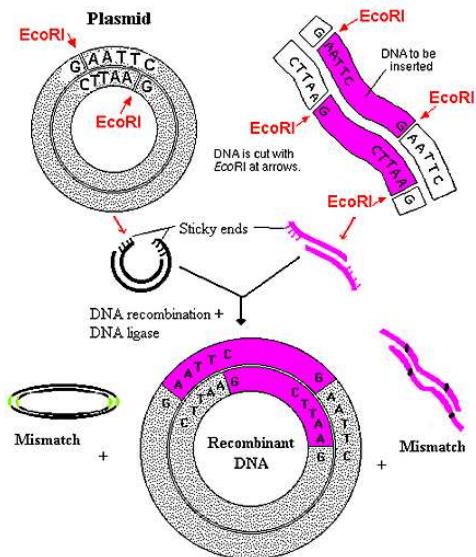
| enzym | zdroj | restrikční místo | fragment[kbp] |
|---------|-------------------------------------|--------------------------|---------------|
| AluI | <i>Arthrobacter luteus</i> | AG↓CT TC↑GA | 0.3 |
| BamHI | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H | G↓GATC C C CTAG↑G | 7.0 |
| EcoRI | <i>Escherischia coli</i> R | G↓AATT C C TTAA↑G | 3.1 |
| HaeIII | <i>Haemophilus aegyptus</i> | GG↓CC CC↑GG | 0.6 |
| NotI | <i>Norcadia otitidis-caviarum</i> | GC↓GGCC GC CG CCGG↑CG | <9700 |
| PstI | <i>Providencia stuartii</i> | C TGCA↓G G↑ACGT C | 7.0 |
| TaqI | <i>Thermus aquaticus</i> | T↓CG A A GC↑T | 1.4 |
| HindIII | <i>Haemophilus influenzae</i> Rd | A↓AGCT T T TCGA↓A | 3.1 |



Rekombinace a klonování

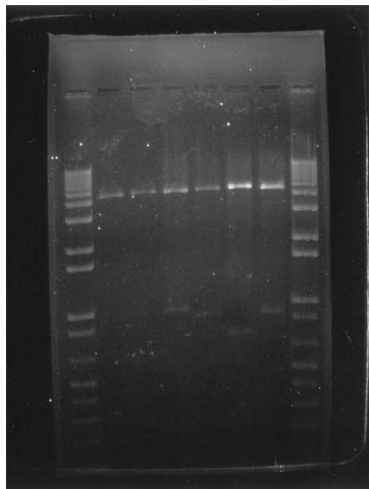


Rekombinace DNA a klonování



Inserting a DNA Sample into a Plasmid

Identifikace DNA na agaróзовém gelu



V laboratoři



A

<http://www.ct.gov/dps/cwp/view.asp?a=2155&q=314998>



B

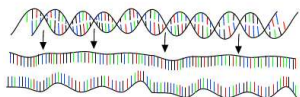
<http://www.sme.sk/c/3753490/Genetika-nadej-pre-pacientov.html>



PCR (polymerázová řetězová reakce)

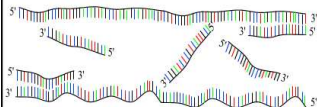
PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

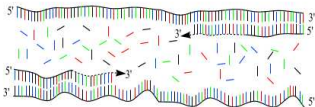
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

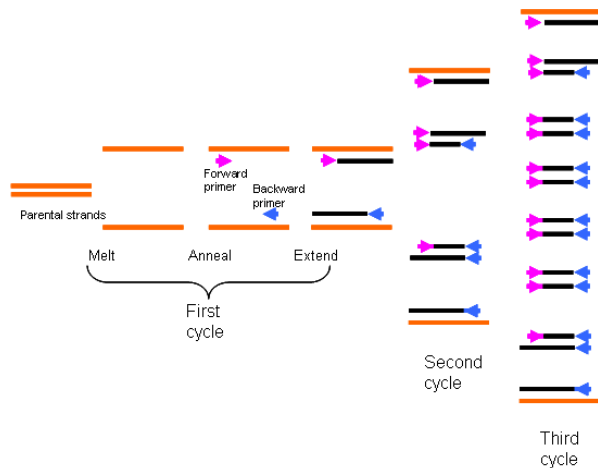
2 minutes 72 °C

only dNTP's

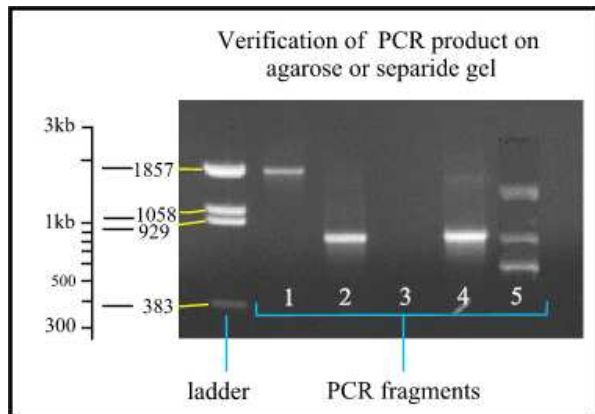
(Andy Veenstra 1999)



PCR (polymerázová řetězová reakce)



PCR (polymerázová řetězová reakce)



PCR (polymerázová řetězová reakce)



Sekvence DNA

- ▶ Pořadí nukleotidů ve směru 5' → 3' uloženo pro budoucí generace jako dlouhý řetězec symbolů A, C, G a T
- ▶ Dobrá zpráva pro budoucnost bioinformatiků: zatím je osekvenováno jenom asi 1000 organismů, data budou přibývat
 - ▶ Polymorfismus: Rozdíl mezi jedinci Homo sapiens sapiens 1/1000 bází
 - ▶ Personal Genomics Project (PGP)

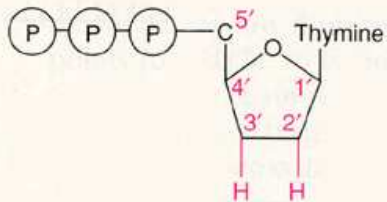


Sekvence DNA

- ▶ Sekvenace se dělá ve dvou fázích
 - ▶ Za použití DNA polymerázy a směsi normálních a modifikovaných deoxyribonukleotidů se syntetizují vlákna DNA (imitace replikace), templátem je sekvenovaná molekula DNA
 - ▶ Produkty polymerizace se v automatických strojích chromatograficky dělí podle velikosti a vypovídají o sekvenci
- ▶ Jedna reakce podá informaci o 500-1000 bazích



Dideoxynukleotid neumožňuje navázání dlažích nukleotidů



Dideoxythymidine triphosphate (ddTTP)

Polymeráza se zastaví při použití ddNTP

DNA Polymerase reads the template strand and synthesizes a new second strand to match:



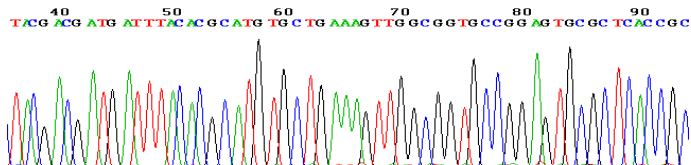
IF 5% of the T nucleotides are actually dideoxy T, then each strand will terminate when it gets a ddT on its growing end:



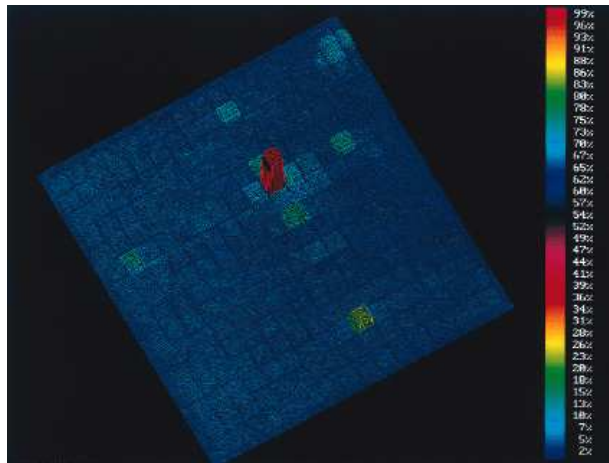
Výsledek automatického sekvenování



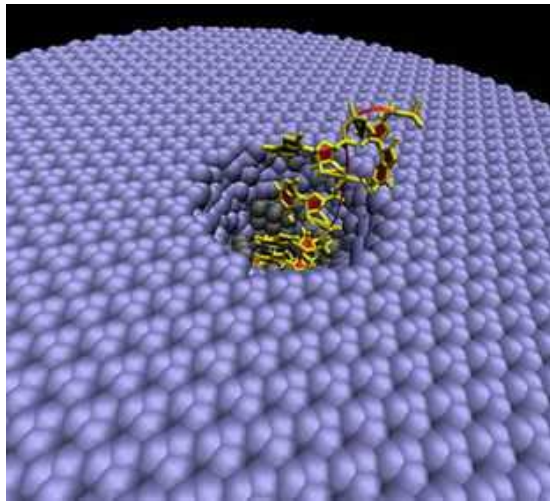
Výsledek automatického sekvenování



Sekvenace hybridizací je založena na vázání se DNA na destičku s různými oligonukleotidy



Přechod DNA pórem v membráně nitridu silikonu generuje elektrický signál, který by mohl umožnit sekvenování

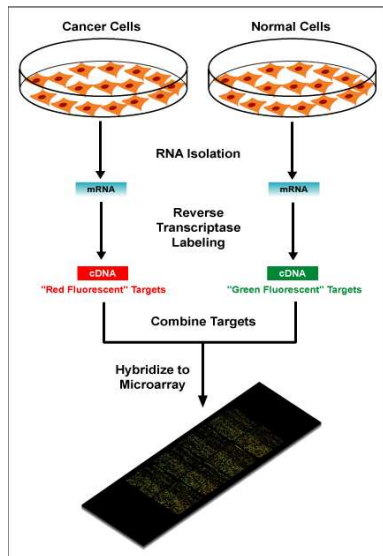


Historie sekvenace genomů

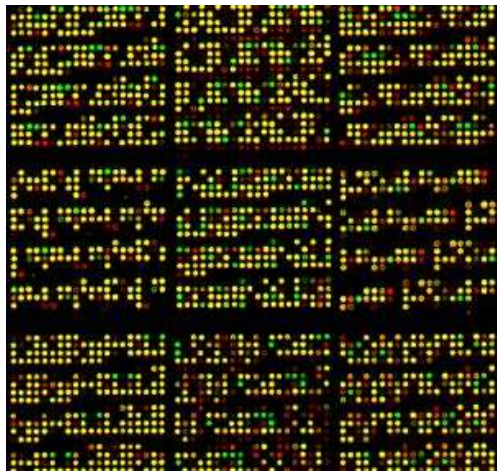
| | | |
|------|---------------------|-----------|
| 1975 | bakteriofag MS2 | |
| 1977 | bakteriofag PhiX174 | 5,375 bp |
| 1982 | bakteriofag Lambda | |
| 1984 | HIV-1 | |
| 1990 | virus HCMV | 230 Kbp |
| 1995 | H. influenzae | 1,83 Mbp |
| 1996 | E. coli | 4,60 Mbp |
| 1996 | S. cerevisiae | 12,00 Mbp |
| 1998 | C. elegans | 96 Mbp |
| 2000 | D. melanogaster | 120 Mbp |
| 2000 | A. thaliana | 130 Mbp |
| 2001 | H. sapiens | 3 000 Mbp |
| 2001 | M. musculus | 3 000 Mbp |



Microarray



Microarray

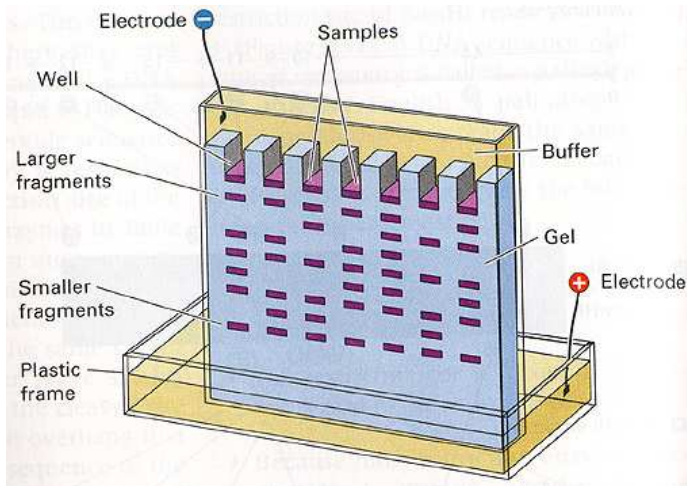


Techniky manipulující proteiny

- ▶ izolace z buněk
- ▶ elektroforéza (dělení podle velikosti)
- ▶ zjišťování aktivity
- ▶ štěpení peptidázami
- ▶ určování sekvence
- ▶ generování protilátek pro daný protein
- ▶ ELISA a podobné testy
- ▶ produkce rekombinantních proteinů (např lacZ, GFP)
- ▶ krystalizace a určování struktury
- ▶ hmotnostní spektrometrie



SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu)

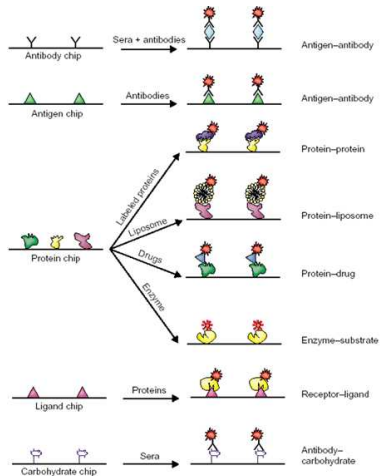


Sodium

dodecyl sulfát denaturuje proteiny a dává vzniklým komplexům záporný náboj

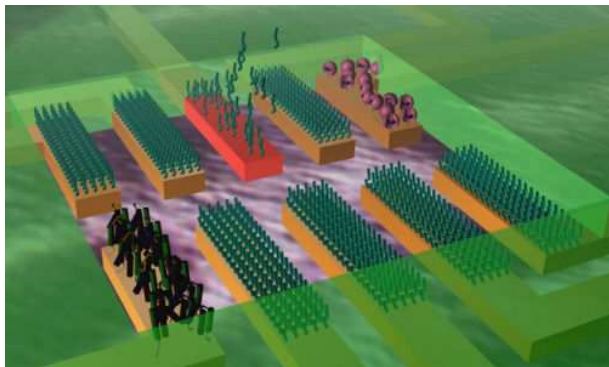


Pole na bázi proteinů

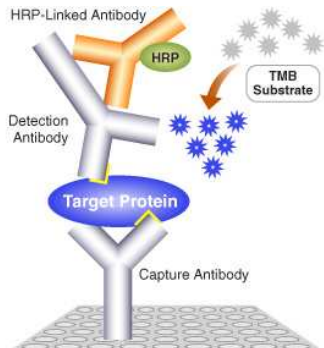
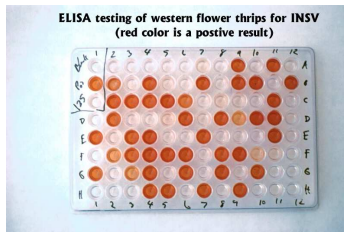


Current Opinion in Chemical Biology

Biosenzory v proteinových čípech



ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)



Slovní pojmů molekulární biologie

| | | |
|--------------------|----------------|---------------------|
| central dogma | gene | RNA |
| genome | ORF | transcription |
| DNA | gene structure | mRNA |
| nucleotide | promoter | gene expression |
| 3'/5' | intron | microarray |
| hybridization | exon | probe |
| replication | prokaryote | EST |
| DNA polymerase | ATG | translation |
| vector | GC content | codon |
| plasmid | eukaryote | protein |
| sequence | alignment | TATA |
| PCR | enhancer | mass spectrometry |
| DNA sequence | silencer | signal transduction |
| proteome | antibody | western blot |
| restriction enzyme | endonuclease | phylogenetics |



Příště

Analýza sekvencí



Outline

Dodatek



For Further Reading

X

