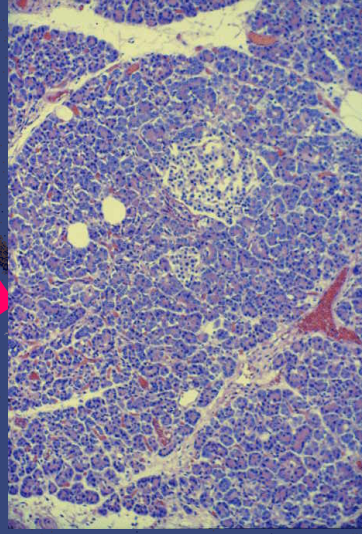
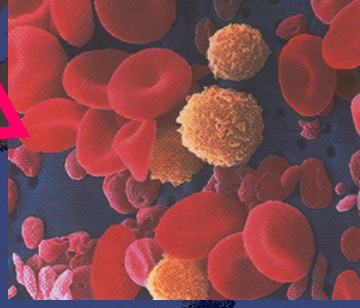
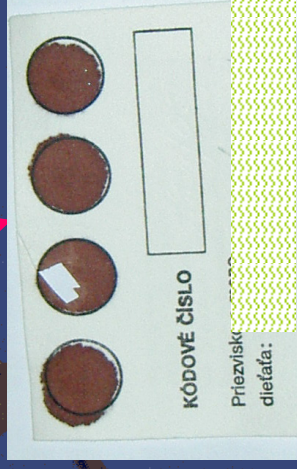
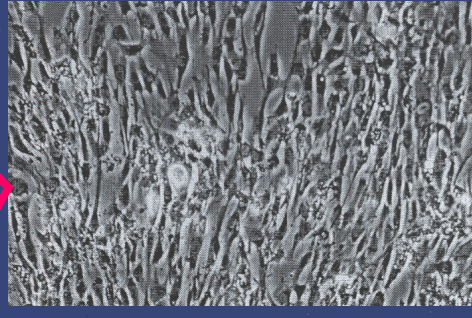
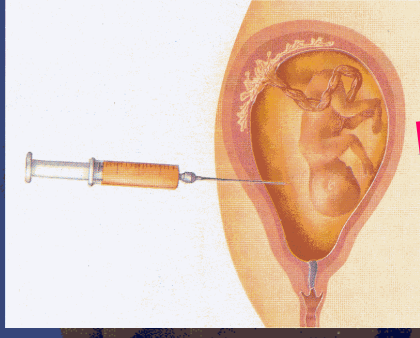


Izolace DNA

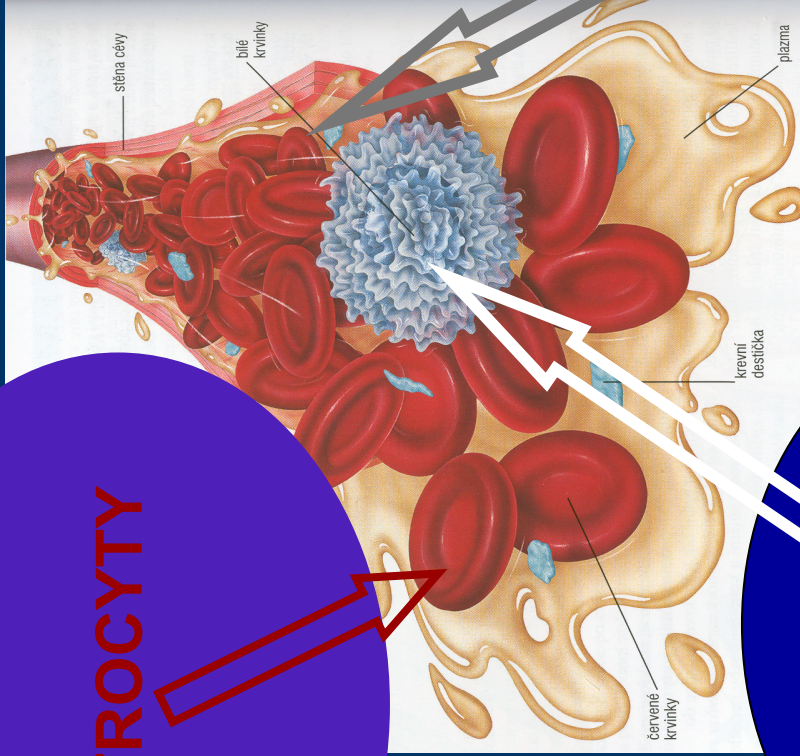


Biologický materiál

pro izolaci DNA



Periferní krev



ERYTHROCYTY

LEUKOCYTY

KREVNÍ DESTIČKY

Nařaděná periferní krev před zpracováním

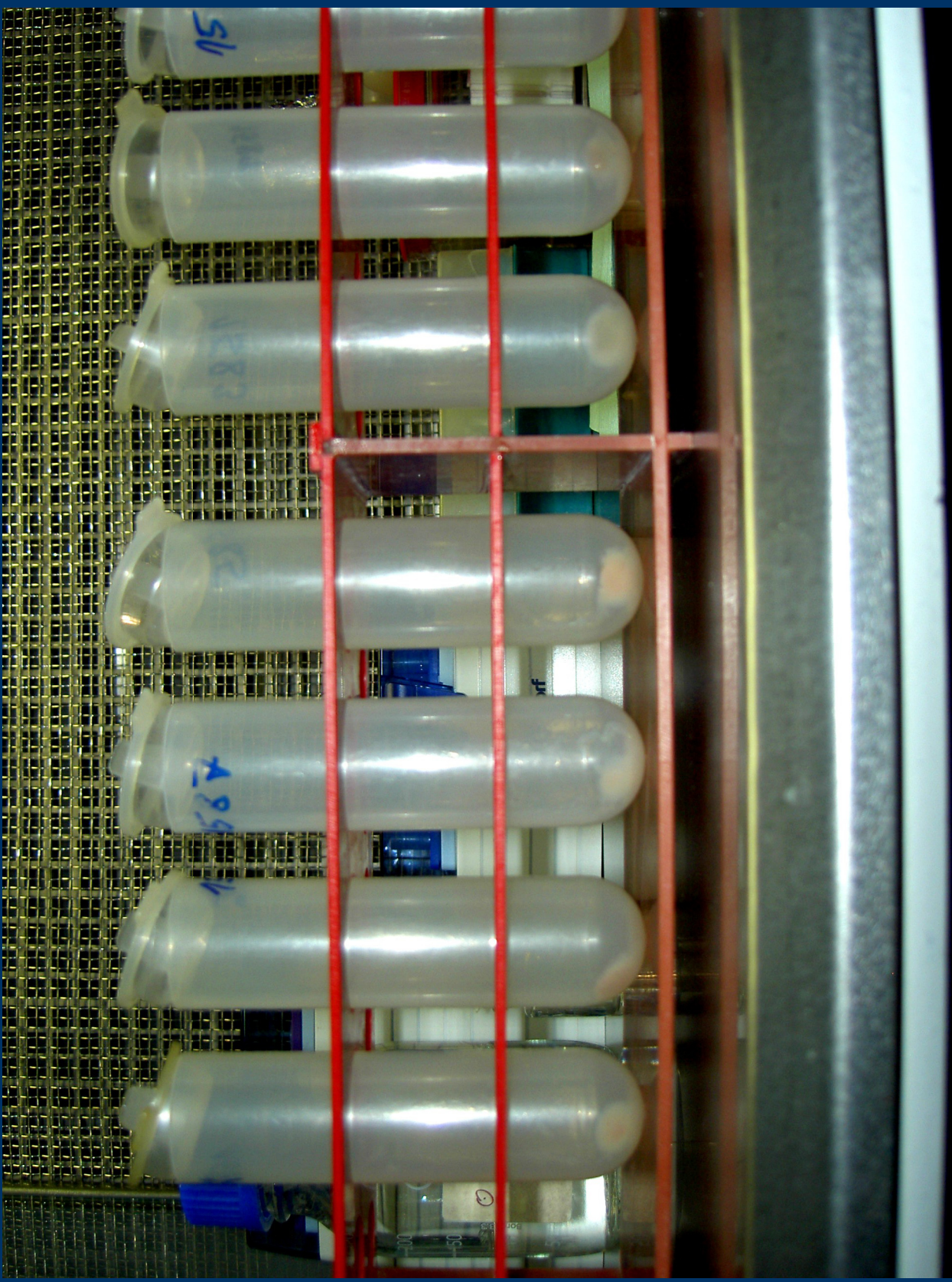




Erythrocyty

Odstranění erytrocytů

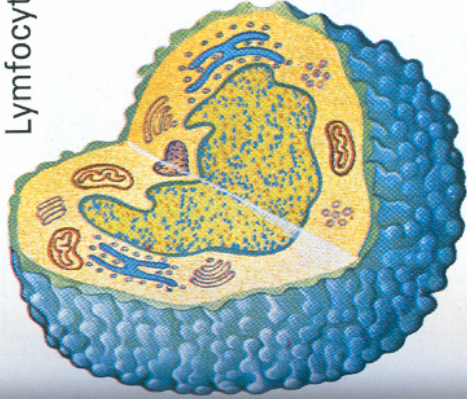
Sediment leukocytü



LEUKOCYTY

IZOLACE DNA Z JEJICH JADER

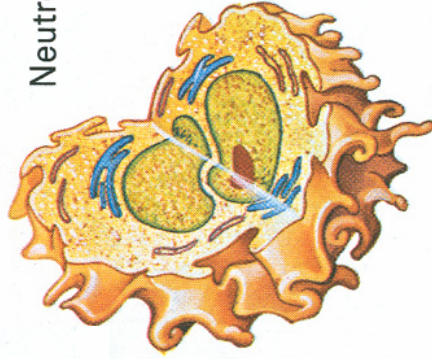
Lymphocyt



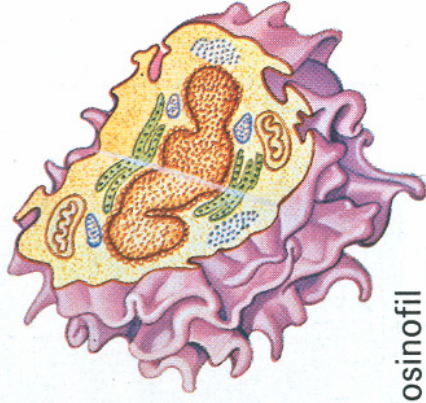
Basofil



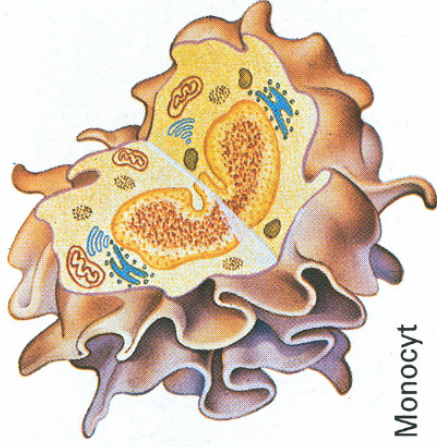
Neutrofil



Eosinofil



Monocyt



Stav po deproteinaci



Vysrážená DNA



Vysrážená DNA



Vysrážená DNA



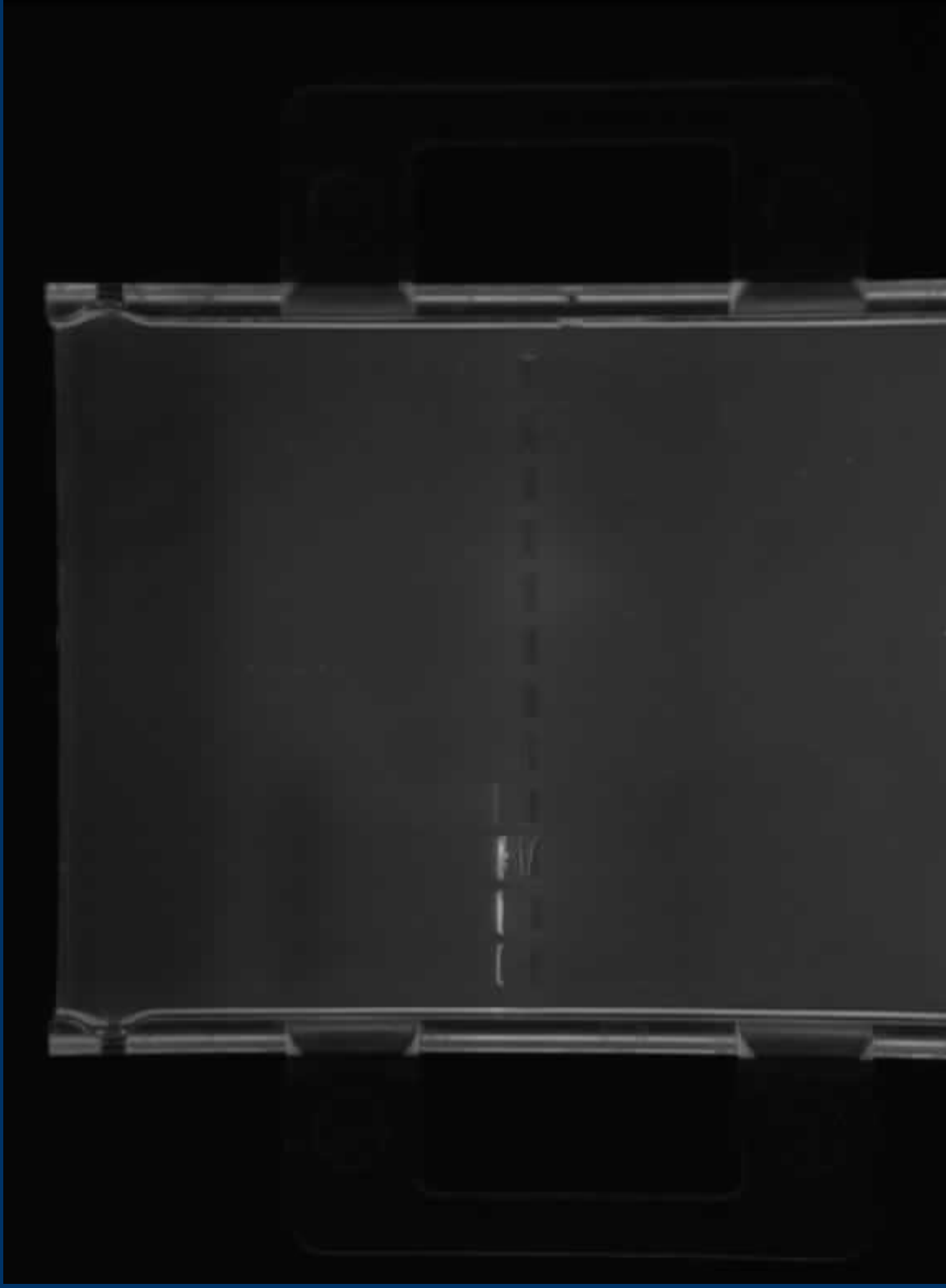
Vysrážená DNA



Měření koncentrace DNA na spektrofotometru



Měření koncentrace a kvality DNA na gelu



Polymerázová řetězová reakce

PCR (Polymerase Chain Reaction)

- 1983 NC- Kary Mullis
- molekulárně biologická metoda umožňující amplifikaci specifické sekvence DNA *in vitro* založená na principu replikace
- umožňuje získat požadovanou zcela specifickou sekvenci bez klonování

REAKČNÍ SLOŽKY:

- DNA (RNA) 50ng -1 µg
- PRIMERY- syntetické oligoN o délce 18-30 N
- TERMOSTABILNÍ POLYMERÁZA (*Taq, Tth, Tma, Pfu, Pwo*)
- dNTPs
- Mg²⁺, pufr, BSA, ...

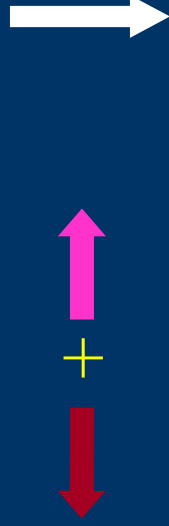
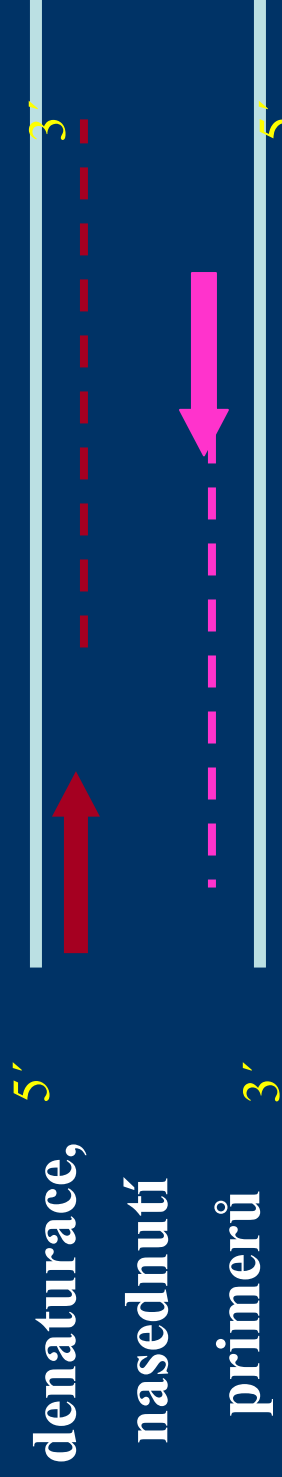
Termocykler- teplota se mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech.

Reakční podmínky:

1. Počáteční denaturace 95 °C, 2-5 min
2. DENATURACE DNA: 94- 95 °C, 20-45s
3. PŘIPOJENÍ PRIMERŮ: ~ 55-65 °C, 30-90s
 $T_a = T_m - 5 \text{ °C} = 2 (A+T) + 4 (G+C) - 5 \text{ °C}$
25 - 35x
4. POLYMERACE: 72 °C, 45-90s
5. Závěrečná extenze- 72 °C , 5 min, dokončení syntézy a renaturace

Teoretický výtěžek 2^n ; n-počet cyklů

PRINCIP PCR



PRŮKAZ AMPLIFIKOVANÉHO PCR PRODUKTU

- Stanovení fyzikální velikosti produktu gelovou ELFO (agarózová , PAGE)- sekvence, délka (bp)
- Štěpení produktu restrikčními enzymy a posouzení spektra restrikčních fragmentů
- Detekce produktu hybridizací se značenou sondou (po ELFO, *in situ*) - Southern blotting

Využití metody PCR

Základní výzkum

- izolace genů nebo jejich částí
- sekvenování DNA
- analýza (selekce) klonů z genových knihoven
- příprava značených sond

Aplikovaný genetický výzkum

- prenatální diagnostika (dědičných chorob)
- detekce mutací v genech
- studium polymorfizmů
- populační genetika

Využití v klinických disciplínách

- detekce mutací v genech asociovaných s monogenně dědičnými chorobami
- detekce patogenů (bakterie, viry, prvoci, houby)
- identifikace onkogenů
- typizace nádorů
- stanovení pohlaví,...

Využití v praxi

- archeologie
- soudnictví (paternitní testy)
- kriminalistika,...

Modifikace PCR

Zpětná (reverzní) PCR (RT-PCR)- amplifikace molekul RNA. RNA se nejdříve přepíše zpětnou transkriptázou do cDNA, která se pak amplifikuje standardním způsobem.

In situ PCR- amplifikace specif. sekvencí NK v buňkách v cytologických preparátech tkání nebo chromozómů.

Multiplex PCR- amplifikace několika specifických sekvencí najednou pomocí dvojic primerů.

Inverzní I-PCR- amplifikace úseků DNA o neznámé sekvenci ohraničené na obou stranách DNA se známou sekvencí.

Princip reverzní transkripce

RNA



Tth, M-MuLV, AMV ↓ Mn²⁺, dNTPs

cDNA



Taq-polymeráza ↓ specifický primer



Amplifikovaná

DNA



Kvantitativní PCR

(real-time PCR, online PCR, kinetic PCR, quantitative PCR; Q-PCR)

Higuchi et al., 1992

- varianta, umožňující přímou kvantifikaci PCR produktu v reálném čase
- amplifikace lze sledovat a kontrolovat průběžně se standardem (housekeeping gene)
- stanovení koncentrace v rozsahu několika řádů
- přesnost a reprodukovatelnost
- uzavřený systém, redukce chyb
- lze poměrně snadno optimalizovat



LightCycler, fa ROCHE