

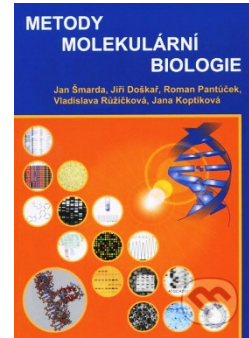
Patofyziologie – cvičení (jaro 2011) Metody molekulární biologie



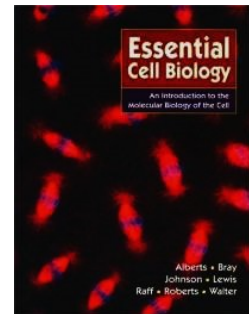
Mgr. Petra Linhartová
peta.linhartova@gmail.com

Doporučená literatura

Šmarda J. a kol.: **Metody molekulární biologie**. Brno 2005



Alberts, Bruce: **Základy buněčné biologie : úvod do molekulární biologie buňky : Essential cell biology (Orig.)**.



Rosypal, Stanislav: **Úvod do molekulární biologie**

Rosypal S. a kol.: **Terminologie molekulární biologie**. Brno, 2001.

Mazura I. a kol.: **Speciální metody molekulární biologie**. Praha, 2001.

Průběh cvičení

1) Teoretický část

- Metody molekulární biologie
- Využití molekulárně biologických metod
(**MUDr. Vendula Bartáková**)

2) Praktická část

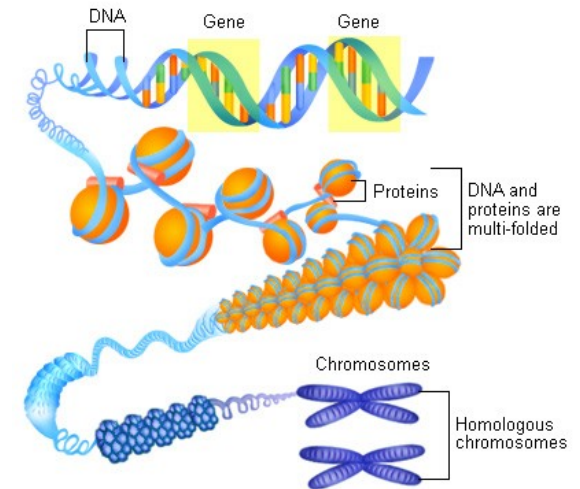
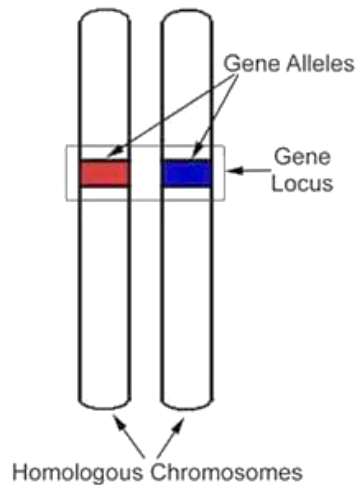
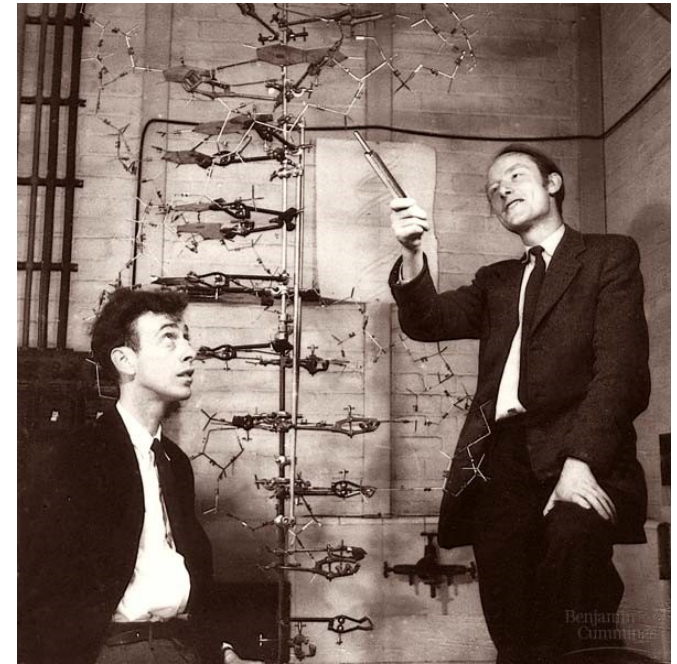
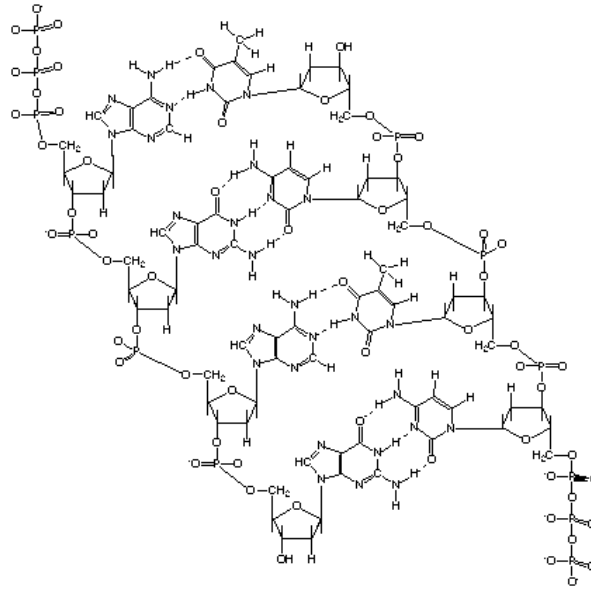
- Polymerázová řetězová reakce (PCR)
- Izolace NA (**Mgr. Veronika Tanhäuserová**)
- RealTime PCR (**Mgr. Marián Hlavna**)
- Sekvenování (**Mgr. Jolana Lipková**)
- Tkáňové kultury (**Mgr. Katarína Kuricová**)

Základní pojmy

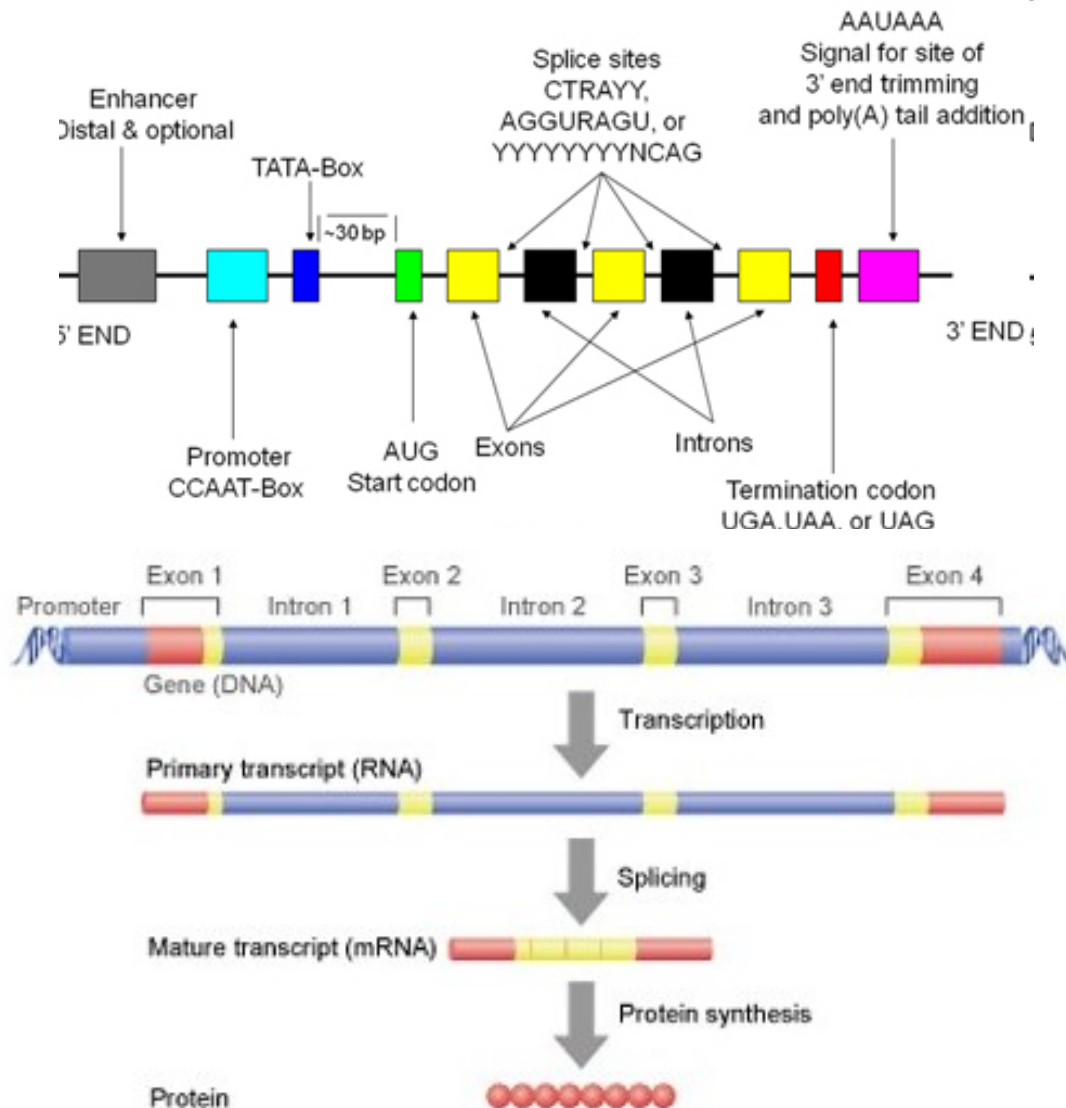
- DNA
- báze
- gen
- lokus
- alely
 - dominantní
 - recesivní

- homozygot
- heterozygot

- genom
- genotyp
- fenotyp

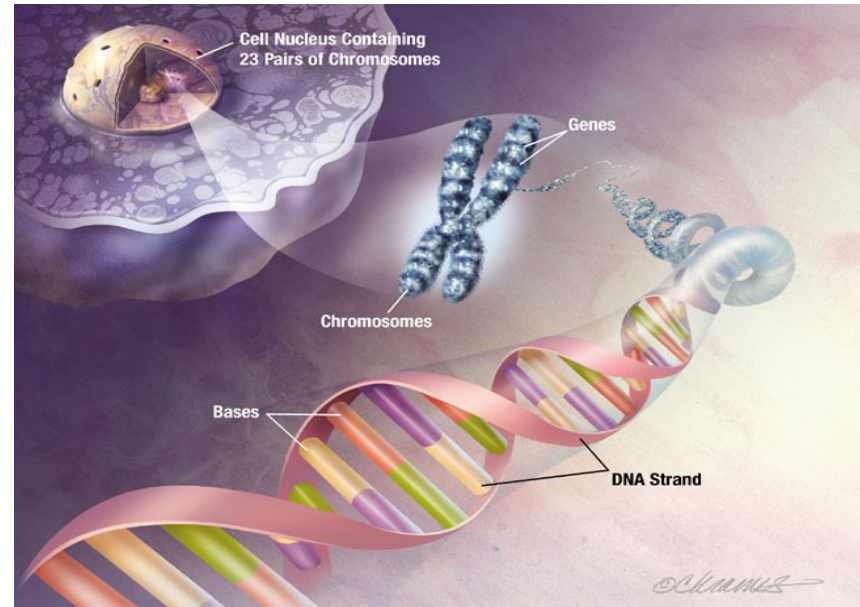


Struktura a organizace genu



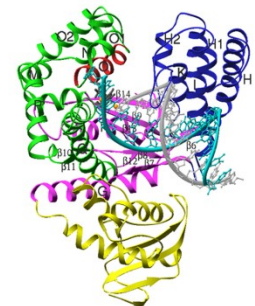
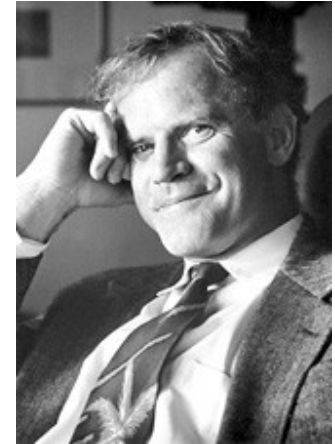
Lidský genom

- HGP 2001
- 3.10^9 bp
- 21000 1000 genů
- sekvence
 - jedinečné
 - repetitivní
 - a) tandemové
 - satelity – 20bp-kb
 - minisatelity – 10-20bp
 - mikrosatelity – 1-5bp, nejčastější
 - b) rozptýlené
 - krátké (SINE) př.Alu
 - dlouhé (LINE) př.L1



PCR

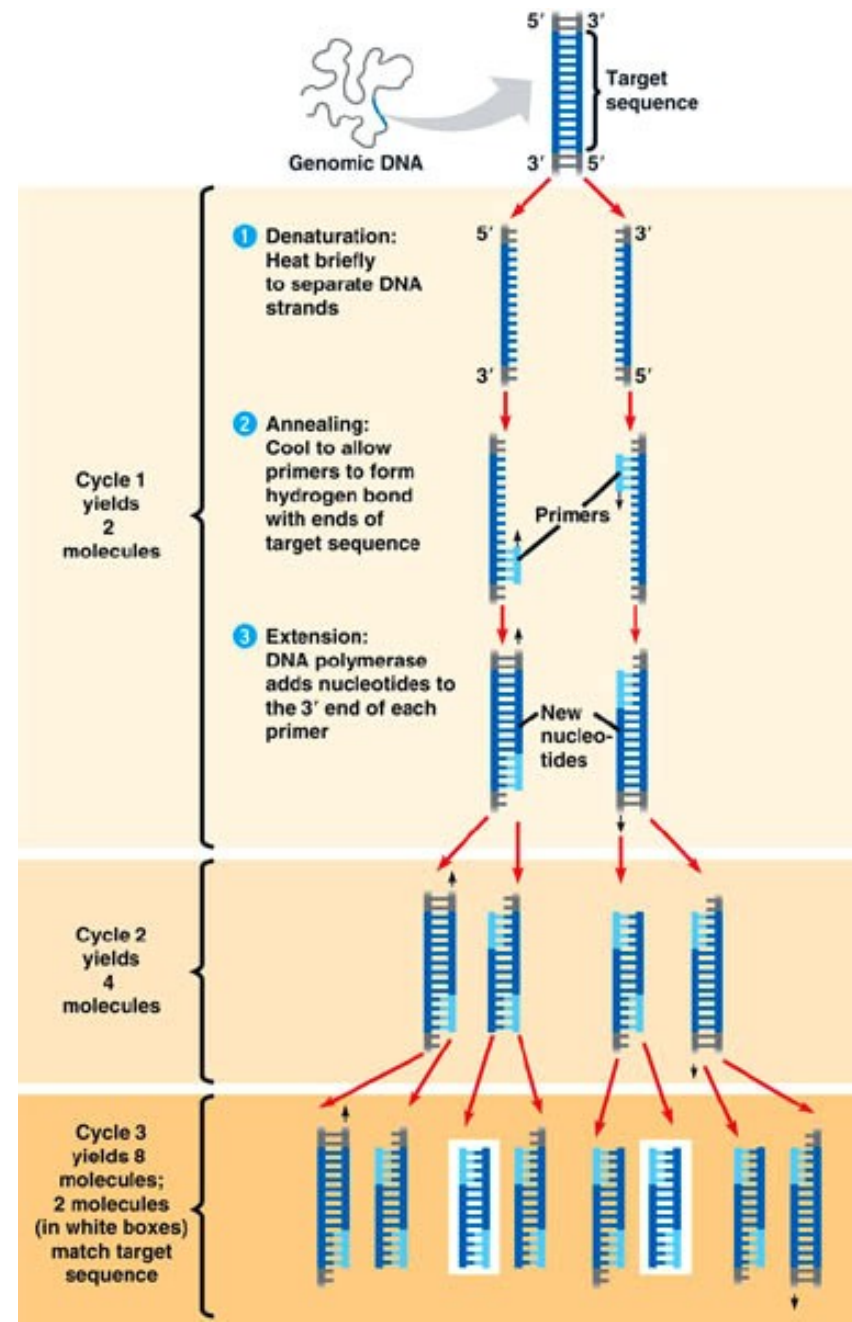
- popsal v r. 1983 Kary B. Mullis, 1993 NP
- princip: enzymatická amplifikace DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích (denaturace, annealing, extenze)
- výsledek: počet kopií dané sekvence DNA- 2^n (n-počet cyklů)
- komponenty reakční směsi pro PCR:
 - voda
 - pufr
 - dNTP (dATP+dTTP+dCTP+dGT)
 - $MgCl_2$
 - termostabilní DNA polymeráza (např. Taq z bakterie *Thermus aquaticus*)
 - oligonukleotidové sondy (“primery”) - specifická Ta
 - templátová DNA



PCR



- teplotní režim (v termocykleru):
 - 1) 95°C 2' iniciální denaturace
 - 2) 96°C 30'' denaturace
 - 3) 40-72°C 20'' annealing
 - 4) 72°C 30'' elongace
 - kroky 2 – 4 celkem 30x
 - 5) 72°C 5' závěrečná elongace
 - 6) 4°C 10' zchlazení



PCR

<http://www.youtube.com/watch?v=2KoLnIwoZKU&feature=related>

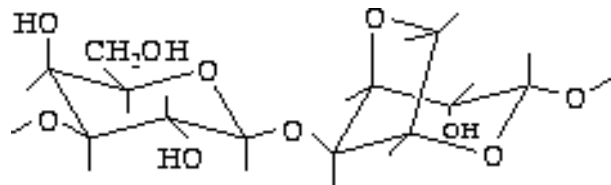
Elektroforéza

- separace NA v elektrickém poli v gelu na základě rozdílného

náboje (amino- či fosfátových skupin) a velikosti

- gel z agarózy (horizontálně)

- lineární polymer z řasy *Agar agar*

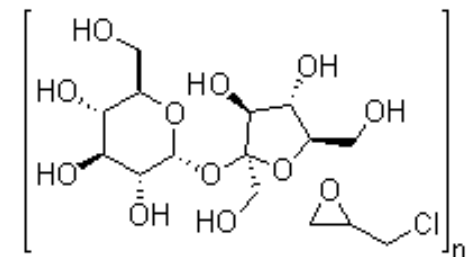


D-galaktosa 3,6-anhydro L-galaktosa



- Loading buffer:

- Ficoll - hustý, drží vzorek na dně
- bromfenolová modř - vizualizace



Ficoll

Elektroforéza

- DNA nutno vizualizovat - fluorescenční barviva - **ethidiumbromid** (EtBr)

UV světlo 590nm, kancerogen, mutagen, teratogen!

- srovnání velikosti produktů a standardu

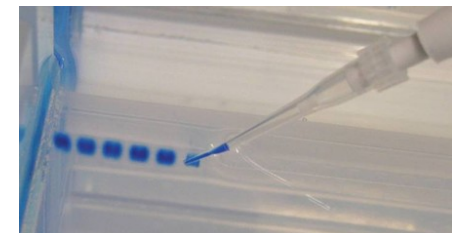
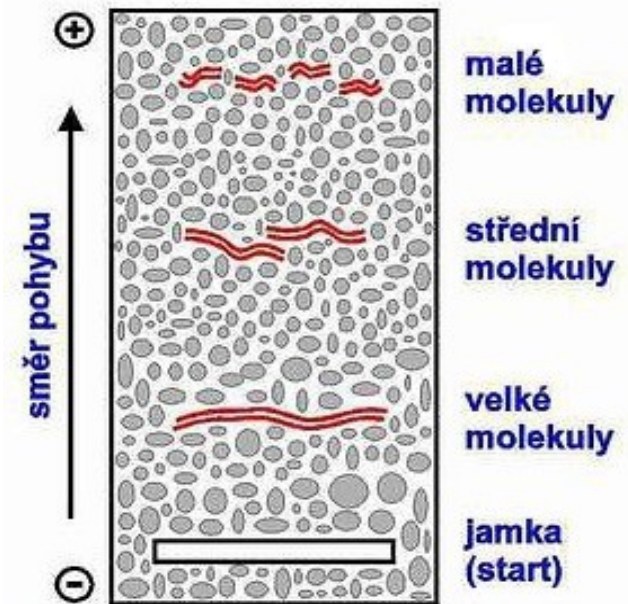
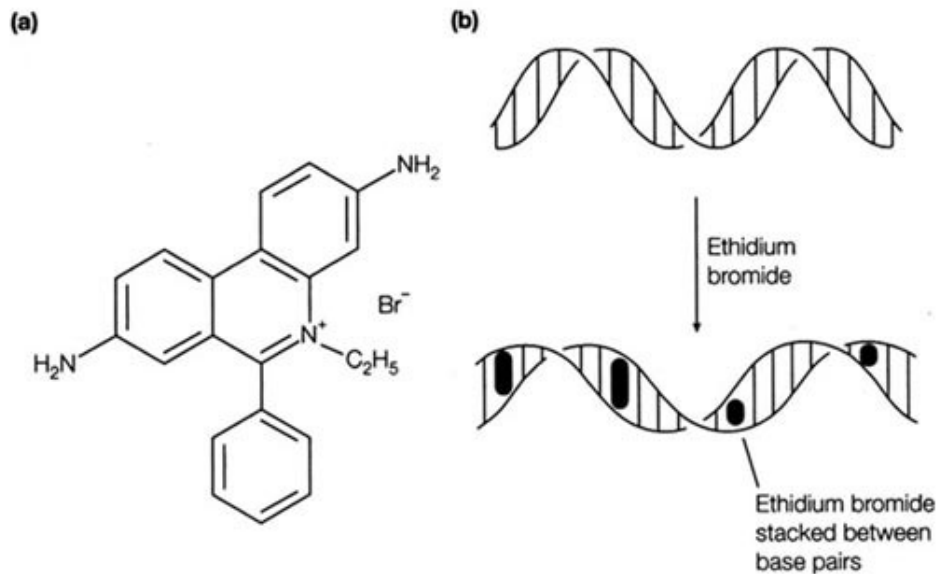
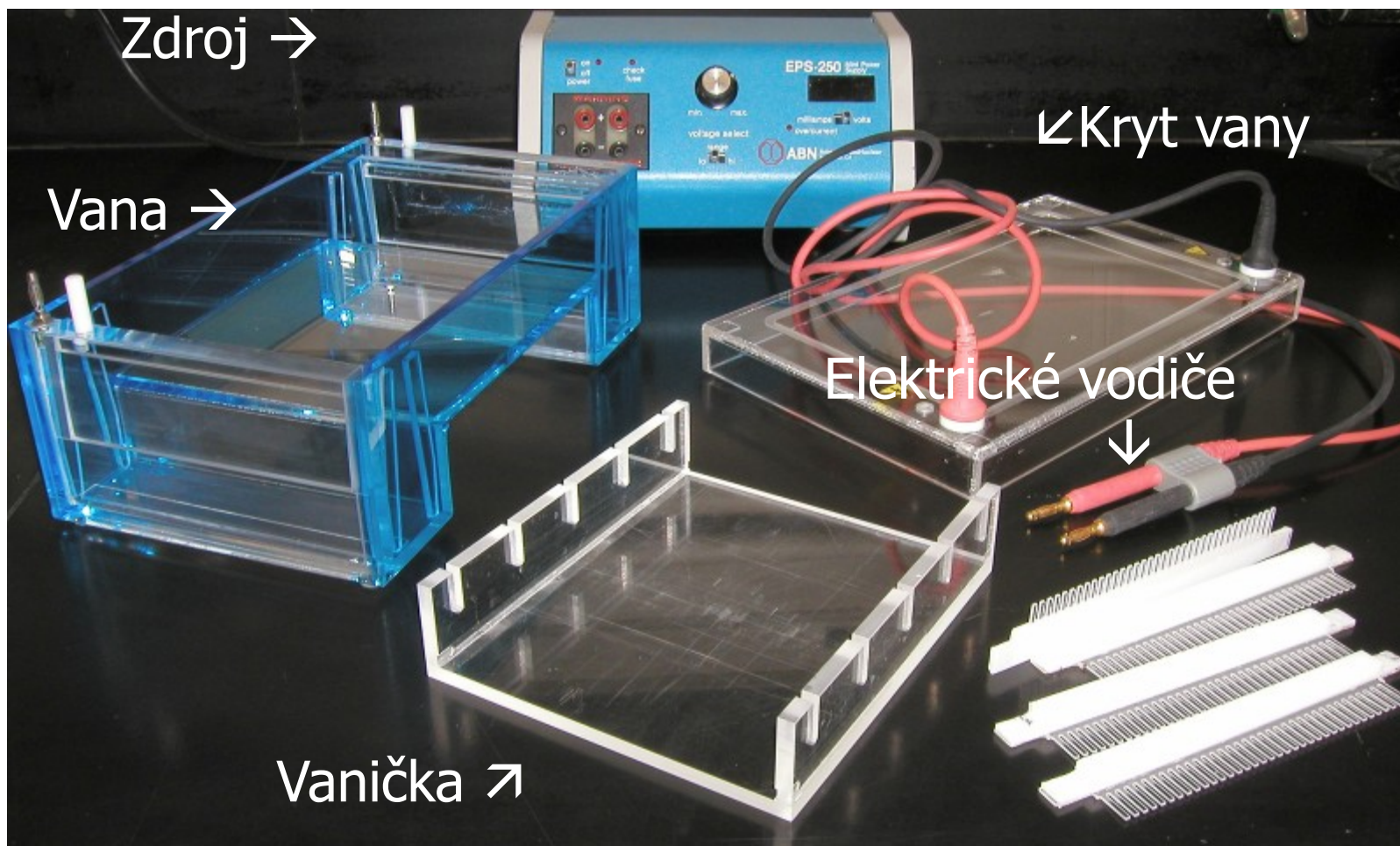


Fig. 3. (a) Ethidium bromide; (b) the process of intercalation, illustrating the lengthening and untwisting of the DNA helix.

Elektroforéza



Zdroj →

Vana →

↙ Kryt vany

Elektrické vodiče



Vanička ↗

Hřebínky ↗

Modifikace PCR

- Reverzně transkripční PCR
- PCR RFLP
- Alelově specifická PCR
- PCR VNTR
- RealTime PCR
- Nested PCR
 - nejprve amplifikace genomické DNA
 - v další PCR reakci je templátem produkt reakce předcházející
 - zvyšování specifity
- Multiplex PCR
 - detekce několika genů současně v jedné reakci
 - detekce deletovaných exonů u Duchenyovy muskulární dystrofie

RT PCR = reversně transkripční PCR

Kopie mRNA

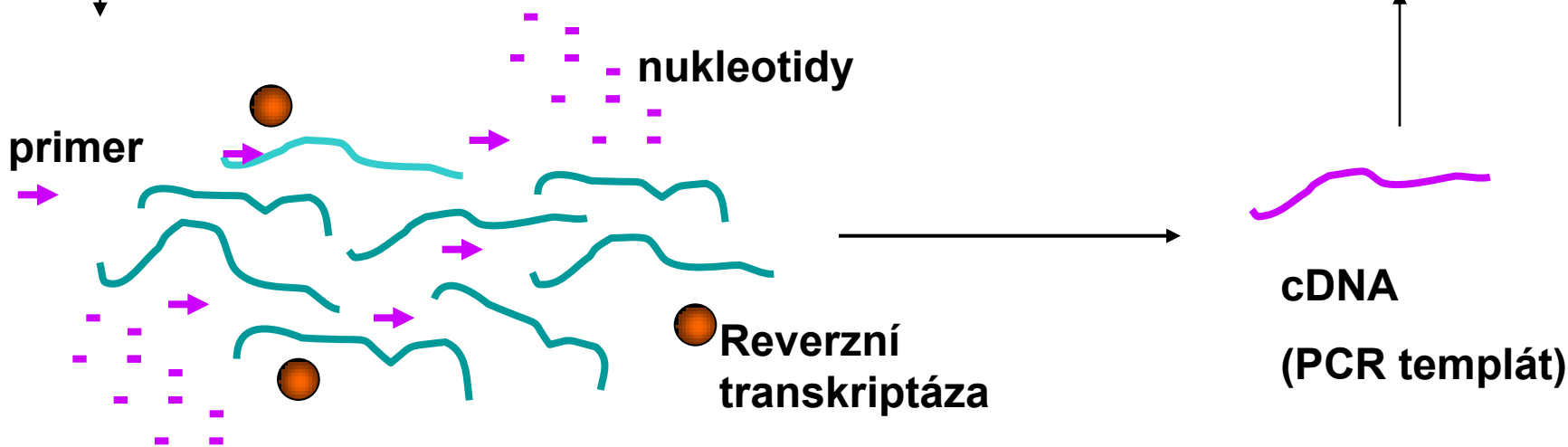
1. Vyšetřovaná RNA

- amplifikace RNA
- RNA-dependentní DNA-polymeráza
- eliminace intronů – poskytuje informace o alternativním sestřihu

2. Reverzní transkripce

- analýza genové exprese
- detekce infekčních agens
- detekce genetických chorob

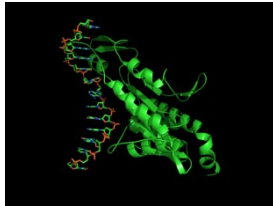
3. PCR



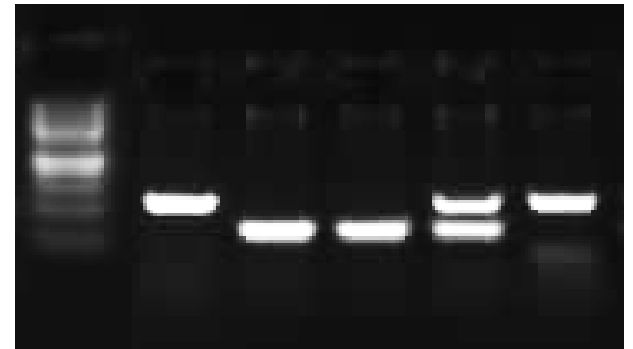
PCR RFLP = analýza délky restričních fragmentů

- analýza DNA pomocí specifického štěpení **restričními endonukleázami** (RE)
- **RE** - enzymy bakterií vyvinuté během evoluce k štěpení cizí DNA
 - název odvozen dle jejich původce - např. **EcoRI** (*E.coli*)

- rozpoznávací specif. oblast



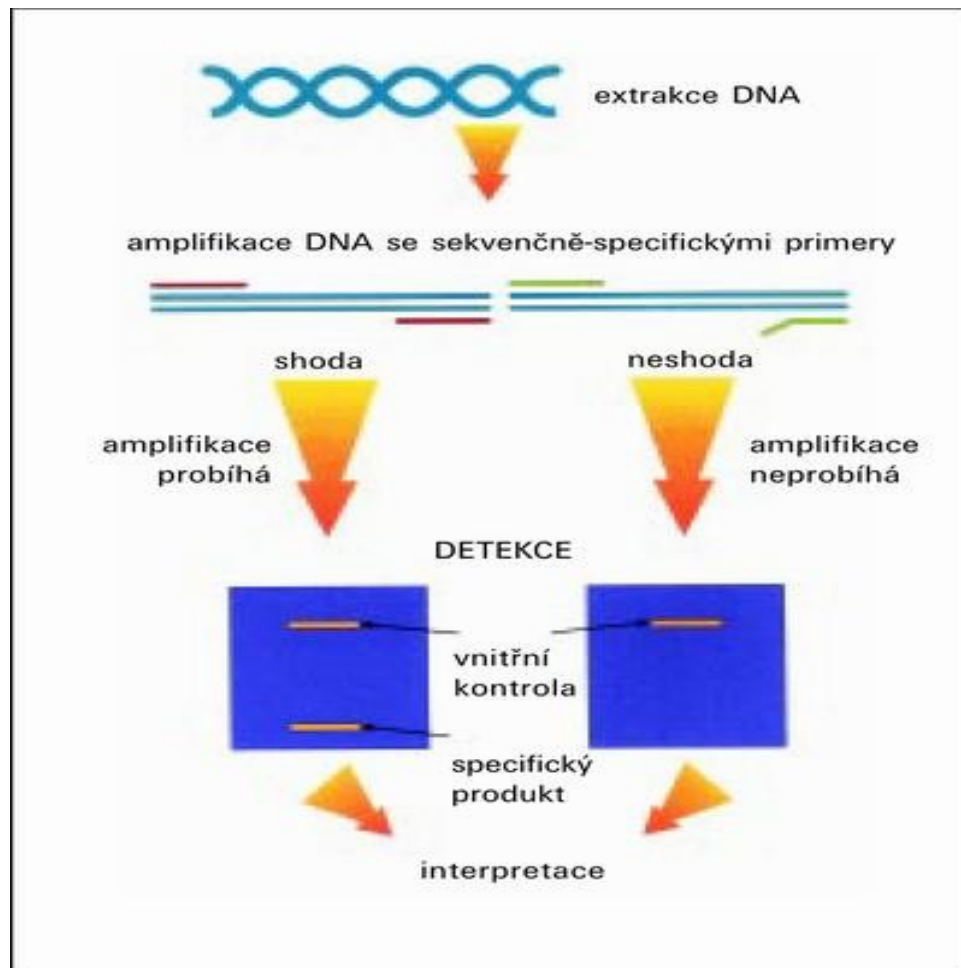
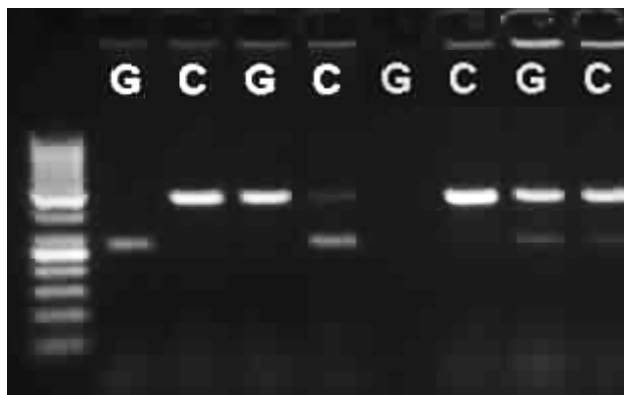
5 -CCT G↓AATTC AGG-3
3 -GGA CTTAA↑G TCC-5



- štěpí vnitřní fosfodiesterové vazby
- schopny rozpoznat a štěpit JEN specifické sekvence
(zamezení bakt. narušení vlastní DNA)
- RE mají specifickou teplotu, při které štěpení probíhá optimálně
- využití - při detekci určité mutace

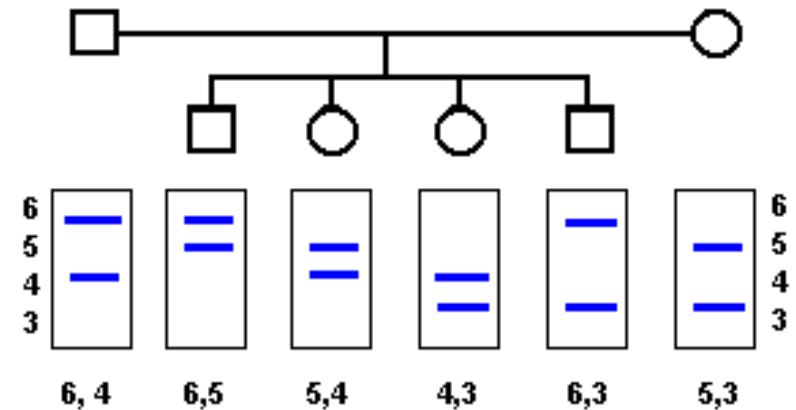
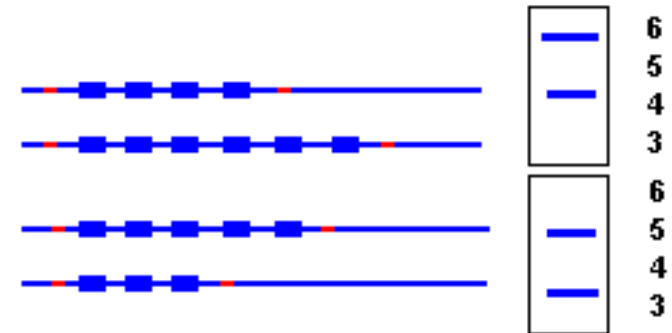
Alelově specifická PCR

- ve dvou nebo více paralelních reakcích
- 3 druhy primerů



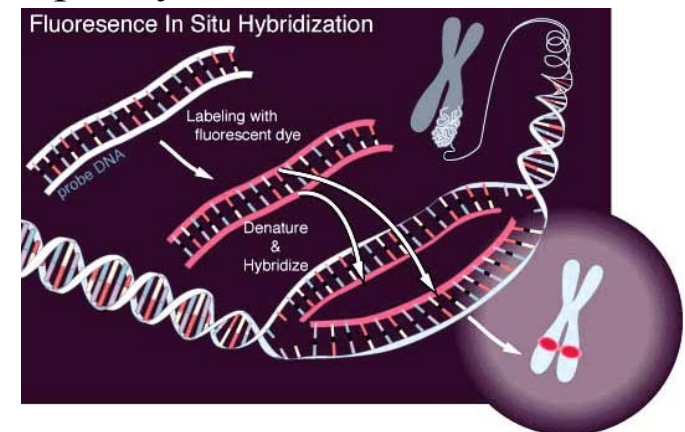
VNTR (Variable Number of Tandem Repeats)

- označuje variabilní počet tandemových opakování, neboli polymorfní úsek DNA (lokus), který je vytvořen tandemovým uspořádáním mnohočetných kopií krátkých sekvencí DNA.
- lokus má v populaci několik alel

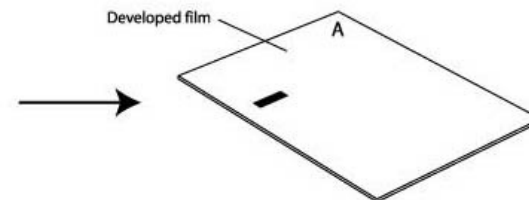
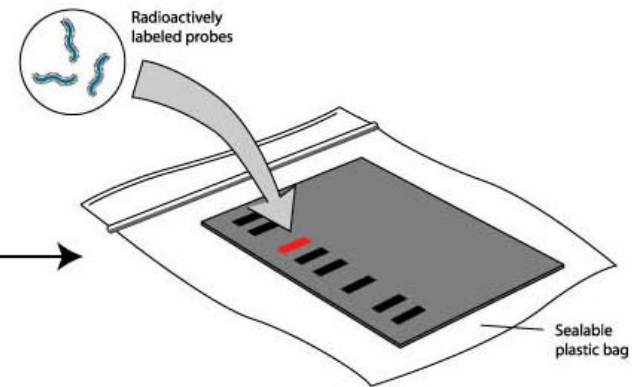
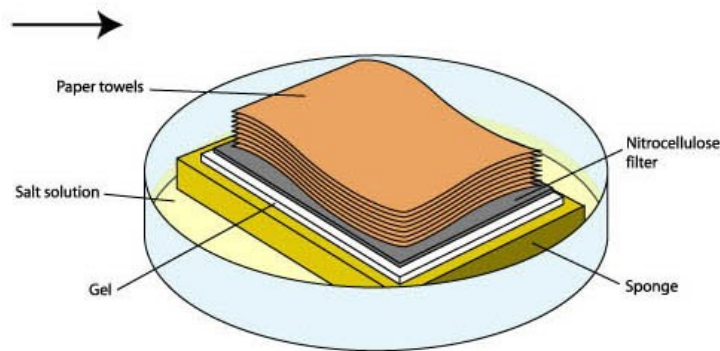
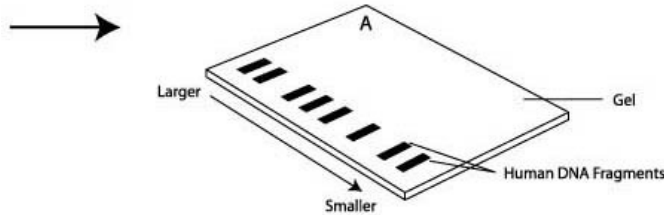
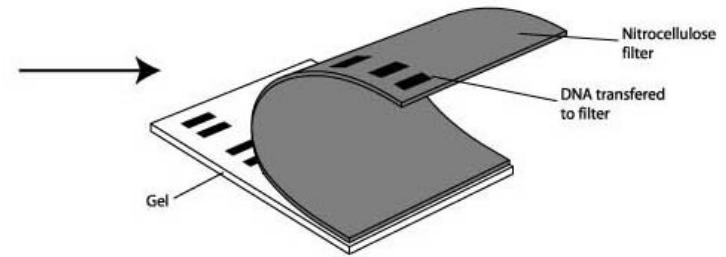
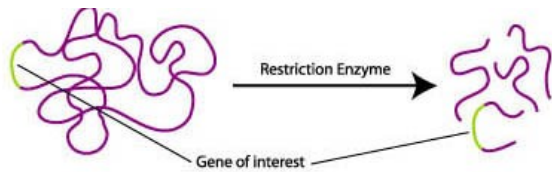


Hybridizace NK

- v roztoku
- na pevných podkladech
 - obvykle nitrocelulózový filtr nebo nylonová membrána
 - přenos po elektroforetické separaci
 - kapilární přenos
 - elektroforetický přenos
 - vakuový přenos
 - typ přenášených molekul
 - DNA - Southernův přenos
 - RNA - Northernový přenos
 - proteiny - Westernový přenos
 - prehybridizace (obsazení volného místa na membráně) – hybridizace (ponoření membrány do roztoku s jednořetězcovou sondou) – promývání nena vázané sondy – detekce sondy
- v preparátech chromozomů, buněk a tkání (*in situ*)
 - fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

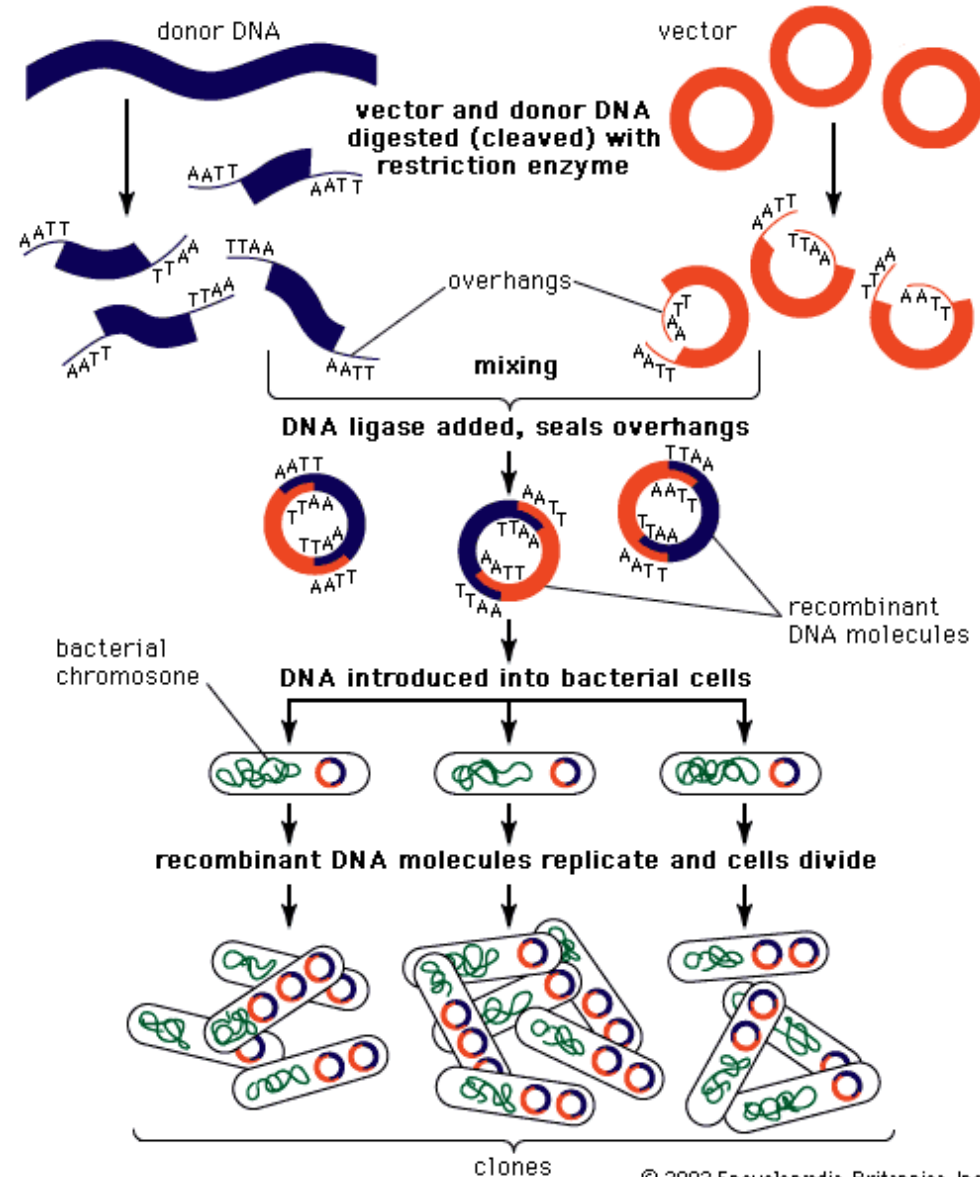


Southernův přenos



Klonování DNA

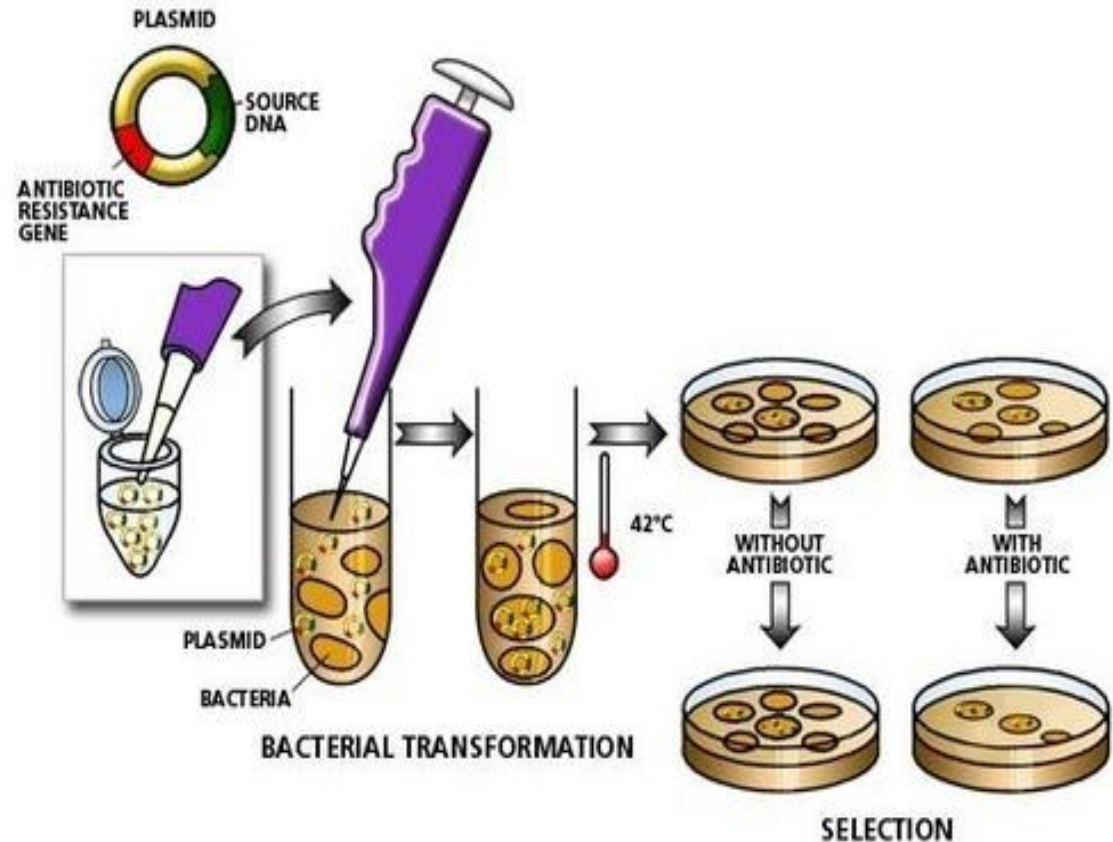
- tvorba souboru identických molekul, fragmentů nebo úseků DNA (klonů DNA) např. množním rekombinantních molekul DNA v hostitelské buňce (*in vivo*) nebo pomocí PCR (*in vitro*)
- rekombinantní DNA vznikne spojením inzertu (cizorodé DNA) s vektorem
- aplikace
 - studium funkce izolovaných genů
 - studium regulačních oblastí genů
 - fyzikální a genetická analýza genomů
 - exprese cizorodých genů a tvorba rekombinantních proteinů



Klonování DNA

■ postup

- příprava inzertu
 - gDNA, cDNA, PCR produkt
- přenos inzertu do vektor
 - transformace, elektroporace
- selekce klonů obsahujících inzert
 - inzerční inaktivace, alfa-komplementace



■ klonovací vektory

- plazmidové (2-15kb)
- fágové (37-52kb)
- kosmidy - hybridy mezi plazmidy a fágy(32-47kb)

Microarray

- <http://www.youtube.com/watch?v=ePFE7yg7LvM&feature=related>



Děkuji za pozornost

Využití metod molekulární biologie v praxi

MUDr. Vendula Bartáková

Oblasti využití metod molekulární biologie

- farmakogenomika / farmakogenetika
- kriminalistika
- prenatální / preimplantační diagnostika
- určování pohlaví
- určování paternity
- identifikace onkogenů
- detekce patogenů
- evoluční genetika



Farmako-genetika x genomika

- **farmakogenetika** se zabývá hledáním vztahu mezi metabolismem, případně efektivitou léčiva a přítomností jednotlivých genetických variant (polymorfismů) genů, které se na absorpci, distribuci, metabolismu, eliminaci podílejí
- **farmakogenomika** zkoumá vztah účinku léku na úrovni celého genomu, resp. transkriptomu
- screening známých genových polymorfismů
- účelná farmakoterapie, minimální nežádoucí účinky

Polymorfismy důležité pro farmakogenetiku

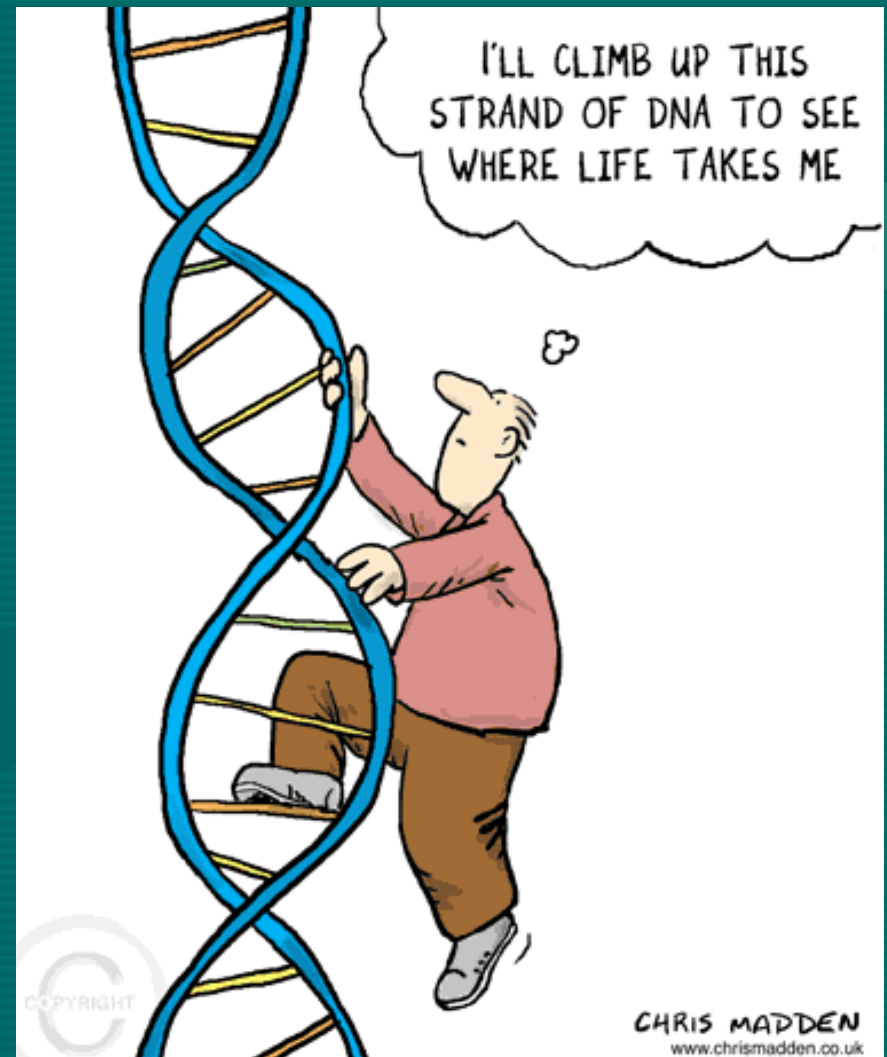
V genech kódujících:

- enzymy lékového metabolismu
- membránové transportní přenašeče
- receptorové proteiny
- proteiny iontových kanálů



Metodiky stanovení genových polymorfismů

- polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)
- PCR
- real-time PCR
- polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)
- sekvencování
- DNA čipy





Kriminalistika



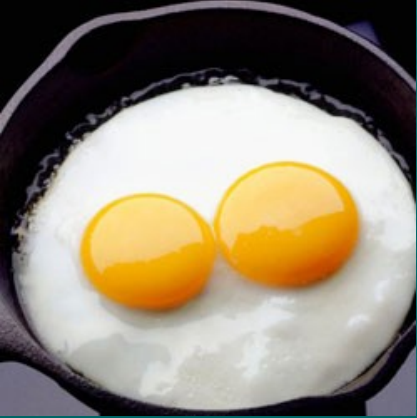
- využití molekulárně biologických metod od 2. pol. 80. let
- porovnání DNA z biologického materiálu zajištěného na místě činu (krev, sliny, sperma, vlas) a DNA podezřelých osob
- větší spolehlivost než metody sérologické (využívány od počátku 20.století) - molekula DNA je daleko stabilnější než antigeny a enzymy



Získání vzorku, využití

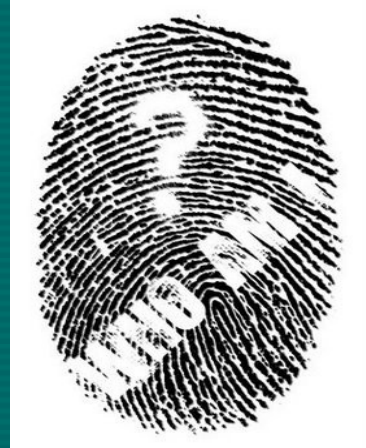


- izolace DNA ze slin, krve, kosti či vlasu
- amplifikace DNA
- analýza namnožené DNA na sekvenátoru - výsledný profil DNA polymorfismů
- celá analýza DNA vyjde přibližně na 1000 Kč - jeden vzorek
- **zjišťování shody** - porovnává se DNA z biologické stopy s DNA jedné či několika osob, aby se zjistilo, ze které osoby materiál pochází
- **zjišťování příbuznosti** - porovnává se DNA několika osob, aby se potvrdila či vyloučila možnost příbuzenského vztahu



Identická dvojčata

Antibody Profile Essay



- test, který využívá komplexní soubor antigenů, přichycených na proužku membrány, které zachytí a rozluští protilátky ze vzorku
- vzorek krve je nanesen na testovací proužek, který se následně promyje speciálními činidly, čímž se označí protilátky - immunoassay test pak zobrazí „čárový kód“ protilátek
- identifikuje podmnožinu protilátek, které jsou unikátní pro každého jedince

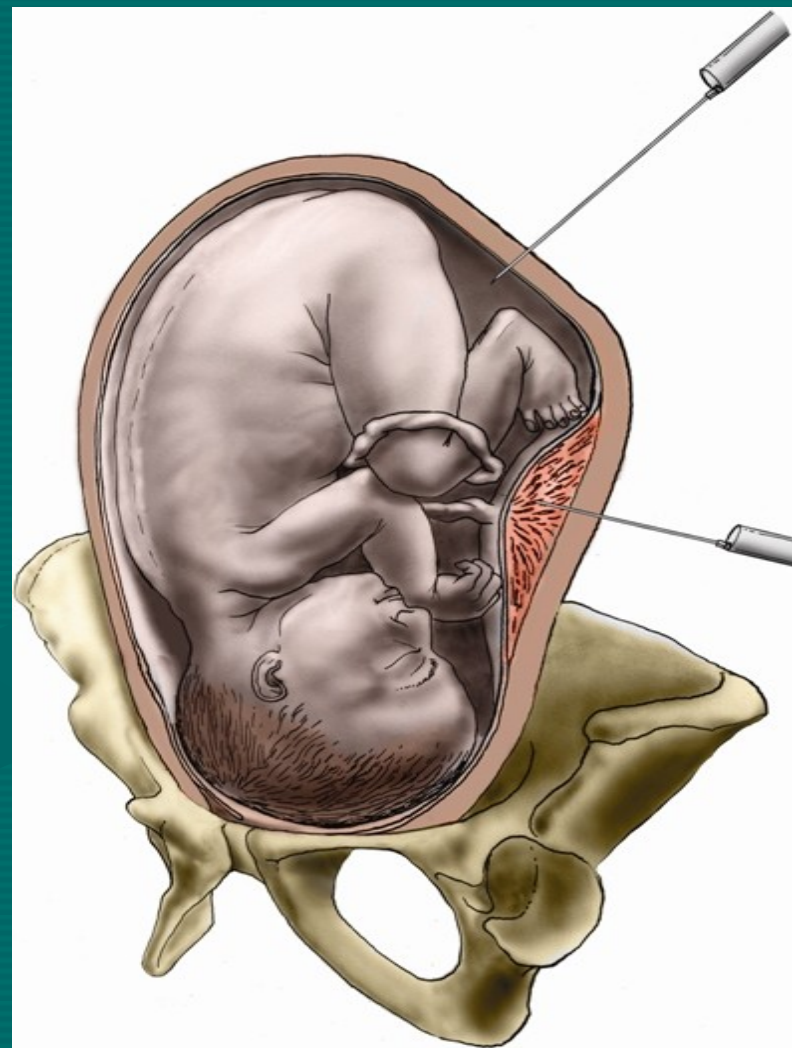
Prenatální diagnostika

neinvazivní postupy

- UZ vyšetření
- biochemický screening

invazivní postupy

- CVS - odběr choriových klků - po 10.t.g.
- AMC - odběr plodové vody
- časná AMC - 12-14.t.g.
- klasická AMC 15-18.t.g.
- pozdní AMC
- kordocenteza - odběr fetální krve z pupečníku, kolem 20.t.g.
- placentocenteza



Preimplantační genetická diagnostika

- umožňuje prenatální vyšetření molekulárně genetickými nebo molekulárně cytogenetickými metodikami
- nutné postupy asistované reprodukce - IVF
- vyšetření 1-2 buněk embrya
- FISH - nejčastější aneuploidie
- DNA - aneuploidie, monogenně podmíněná onemocnění



Určování pohlaví

- pomocí PCR se namnoží úseky pro jednotlivé chromozomy typické
- genetická metoda určení pohlaví využívající úsek genu SRY o délce 204 bp typický pro chromozom Y a gen DXZ4 o velikosti 91 bp chromozomu X



Určování pohlaví

genetická metoda určení pohlaví využívající gen
pro amelogenin

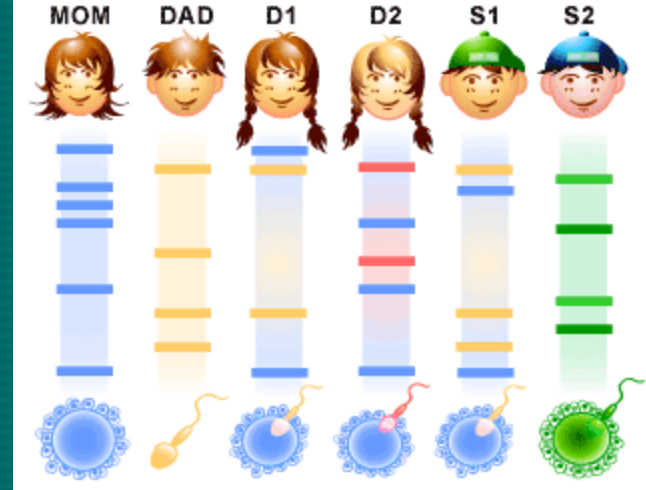
- amelogenin se vyskytuje v pseudoautozomální oblasti gonozomů
- tento gen o délce 112 bp má na X chromozomu v části intronu 1 delecí dlouhou 6 bp, takže po elektroforéze jsou u mužského pohlaví zjištěny dva amplifikační produkty o různé délce a u ženského jen jeden, kratší typ

Určování otcovství



- **dříve** - analýza genových produktů - polymorfizmů erytrocytárních krevně skupinových antigenů, sérových proteinů, izoenzymových variant a antigenních specificit hlavního histokompatibilitního systému člověka
- **dnes** - možné i přímé vyšetření genotypů ve sporu zúčastněných osob metodami DNA diagnostiky, tedy jejich DNA profilování

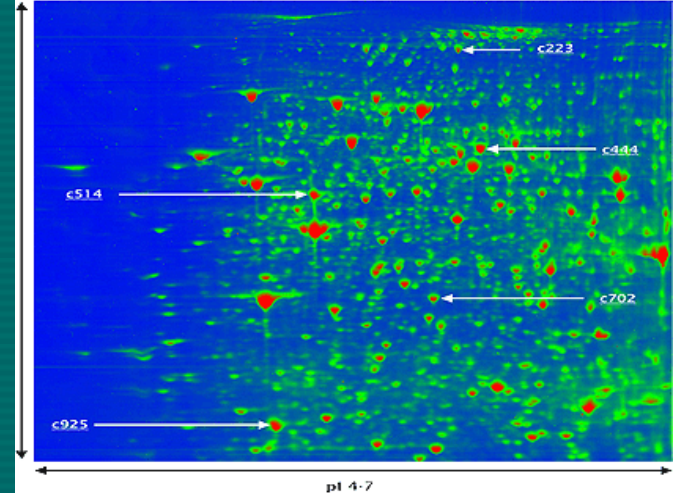
Určování otcovství



- introny genů a mezigenové oblasti - nepřepisují se v bílkoviny a enzymy
- vysoký stupeň interindividuální variability
- nejvhodnější tzv. délkové polymorfizmy DNA, tj. lokusy, jejichž alely se mezi sebou liší různým počtem opakování určitého základního sekvenčního motivu
- minisatelitní sekvence typu VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) a mikrosatelity DNA, čili STR (Short Tandem Repeats)



Jak na to



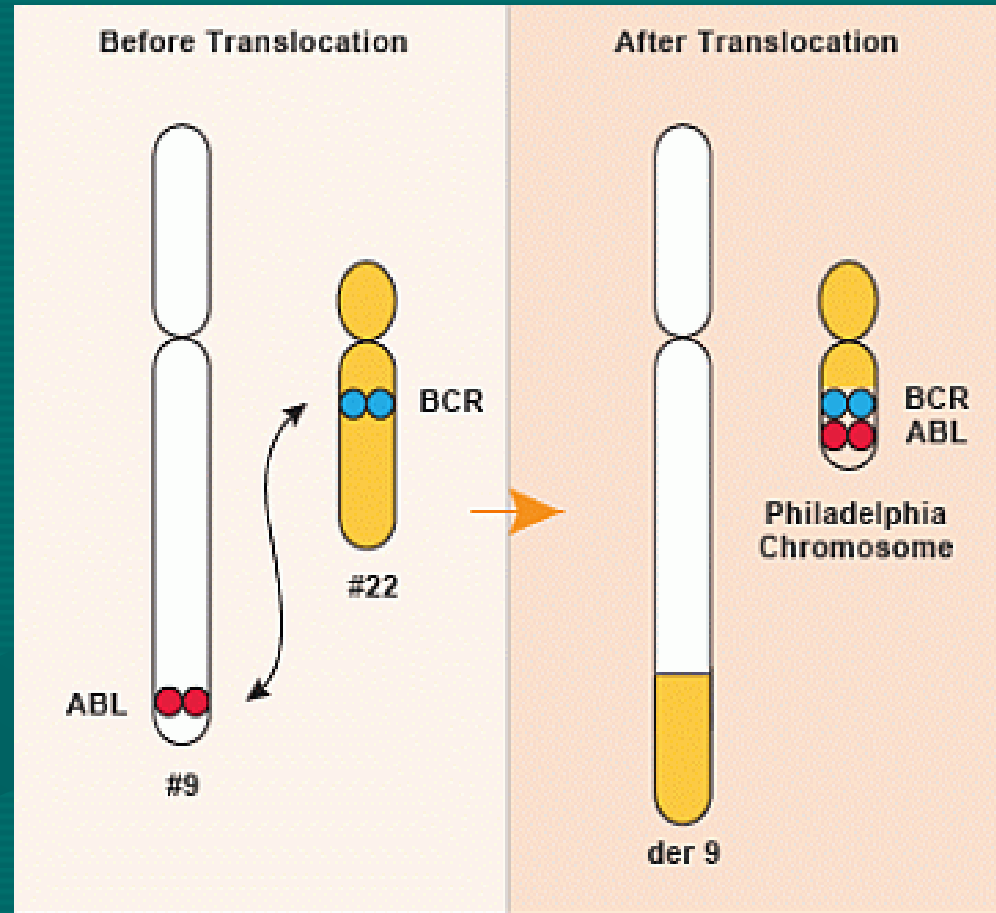
- simultánní amplifikace několika hypervariabilních úseků DNA, mnohočetnou polymerázovou řetězovou reakcí (multiplex PCR) a automatické odečítání alel jednotlivých lokusů po kapilární elektroforéze v genetickém analyzátoru (různé typy kitů pro simultánní detekci 4 až 13 DNA polymorfizmů)
- DNA čipy
- detekce produktů PCR prostřednictvím hmotnostní spektrofotometrie (MALDI-TOF)

Identifikace onkogenů

- podstata nádorové transformace je genetická
- mutace postihují geny signálních drah, kontrolních bodů buněčného cyklu, buněčné diferenciace, apoptózy, reparace DNA...
- v průběhu buněčných dělení jedné buňky nastává postupná akumulace několika mutací v uvedených skupinách genů, které resultují v její nádorovou transformaci

Mechanismy aktivace celulárních onkogenů

- bodová mutace
- zmnožení (amplifikace) genu
- delece (ztráta části sekvence DNA) genu
- přestavba chromozomu
- inzerční mutagenese

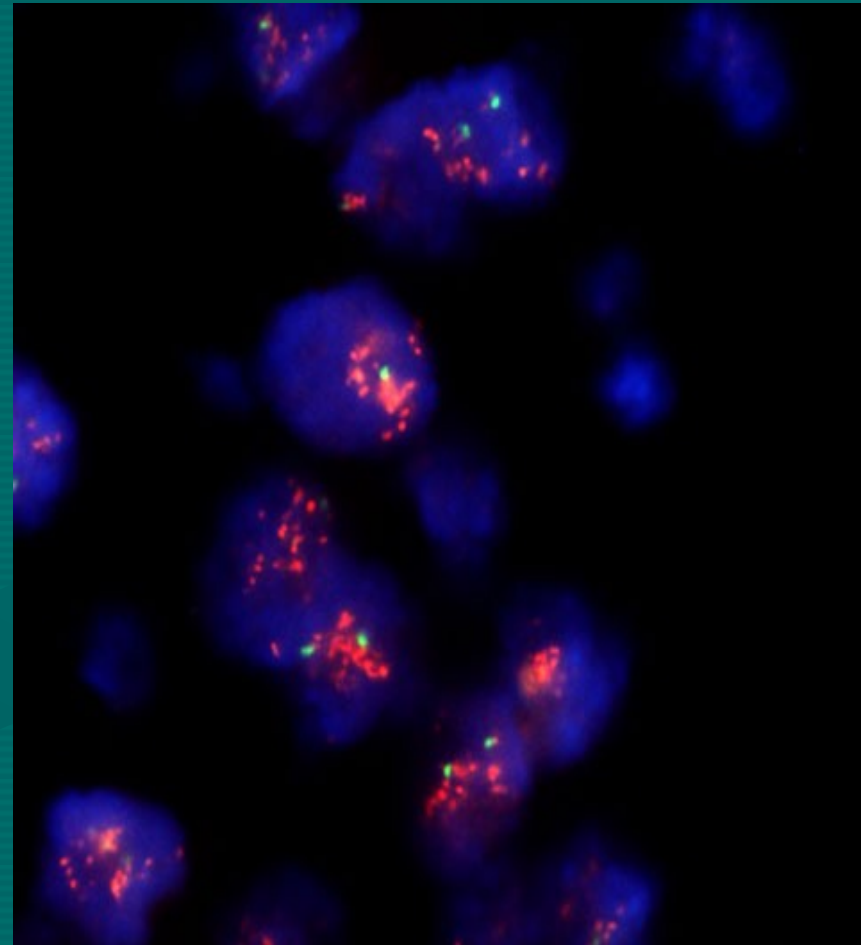


HER2/neu

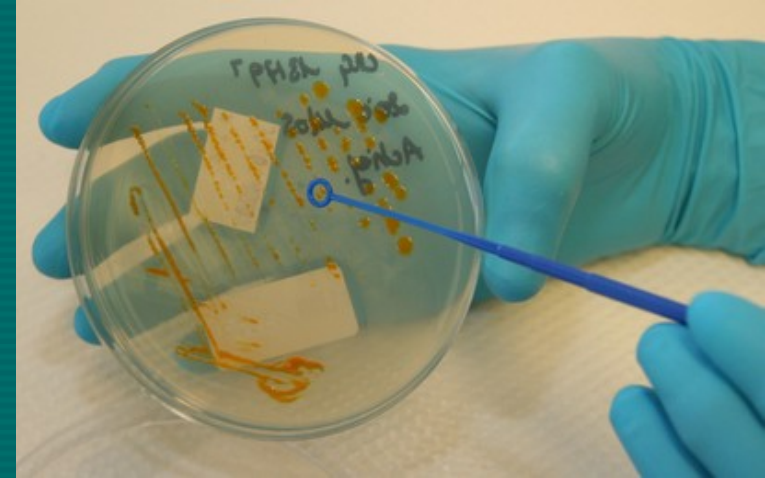
- produkt genu HER2/neu je transmembránový receptor s tyrozin kinázovou aktivitou
- vlastní gen je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu 17 v oblasti q11.2-q12
- amplifikace genu HER2/neu je nalézána u řady nádorových onemocnění.
- overexprese proteinu HER2/neu je důležitým prognostickým a prediktivním faktorem invazivního karcinomu mléčné žlázy

Jaká metoda?

- vyšetření amplifikace HER2/neu za použití FISH s přímo značenými sondami HER2/neu (červená) a CEP17 (zelená)
- HER2/neu je amplifikován, jestliže poměr mezi počty HER2/neu a CEP17 je > 2
- [Video](#)



Identifikace patogenů molekulárně biologickými metodami



- kvalitativní i kvantitativní průkaz virové nebo bakteriální nukleové kyseliny ve vzorku
- velký význam pro sledování rozvoje virové infekce nebo odpovědi na léčbu antivirotiky (např. u infekcí HIV, hepatitidy B a C, CMV infekce)
- detekce úseku genomu zodpovědného za přenos rezistence
- možnost přesně určit sekvence jednotlivých bází, identifikovat genotypy viru nebo bakterie, prokazovat mutace.

Využití molekulárně biologických metod

- u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci orgánů
- u pacientů s infekční endokarditidou
- u pacientů s infekčními komplikacemi po velkých chirurgických výkonech

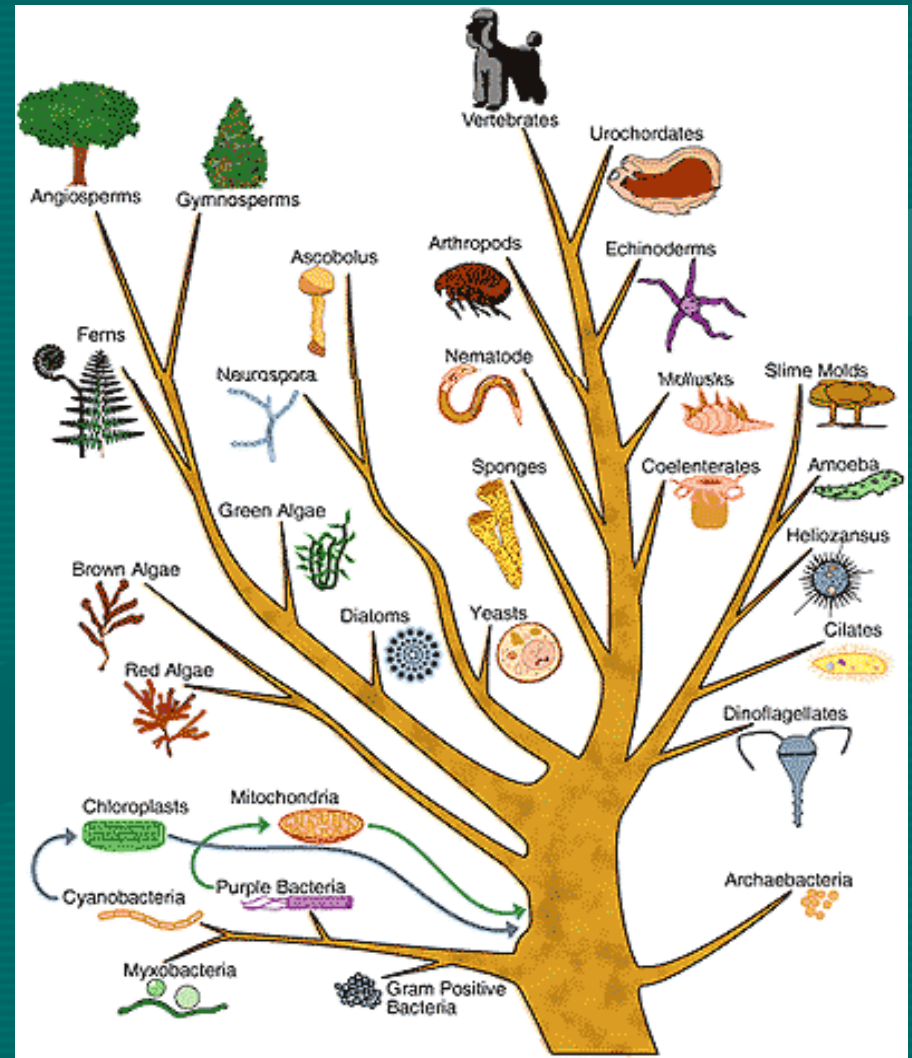
- detekce a identifikace virů, které není možné běžně izolovat na buněčných kulturách nebo prokazovat jejich antigeny v infikovaných buňkách (např. viry hepatitid C a G, lidské papilomaviry, parvovirus B19)
- detekce DNA herpetického viru z likvoru u herpetických infekcí CNS nebo DNA CMV u imunosuprimovaných pacientů po transplantaci orgánů

Evoluční genetika

- analýza sekvencí DNA má výhody oproti tradičním metodám studia evoluce (srovnávací anatomie, fyziologie a embryologie) - sekvence DNA a proteinu sleduje jednoduchá pravidla dědičnosti
- molekulárně sekvenční data umožňují porovnat evoluční vztahy mezi vzdálenými organismy (shrnuty v diagramech – fylogenetické stromy)

Pravidla konstrukce fylogenetických stromů ze sekvencí DNA

- seřazení sekvencí, které umožňují jejich srovnání
- zjištění rozsahu podobnosti nebo rozdílnosti mezi každými 2 sekvencemi
- seskupování sekvencí na základě podobnosti
- umístění sekvencí do vrcholu stromu



No a teď hurá do laboratoří!



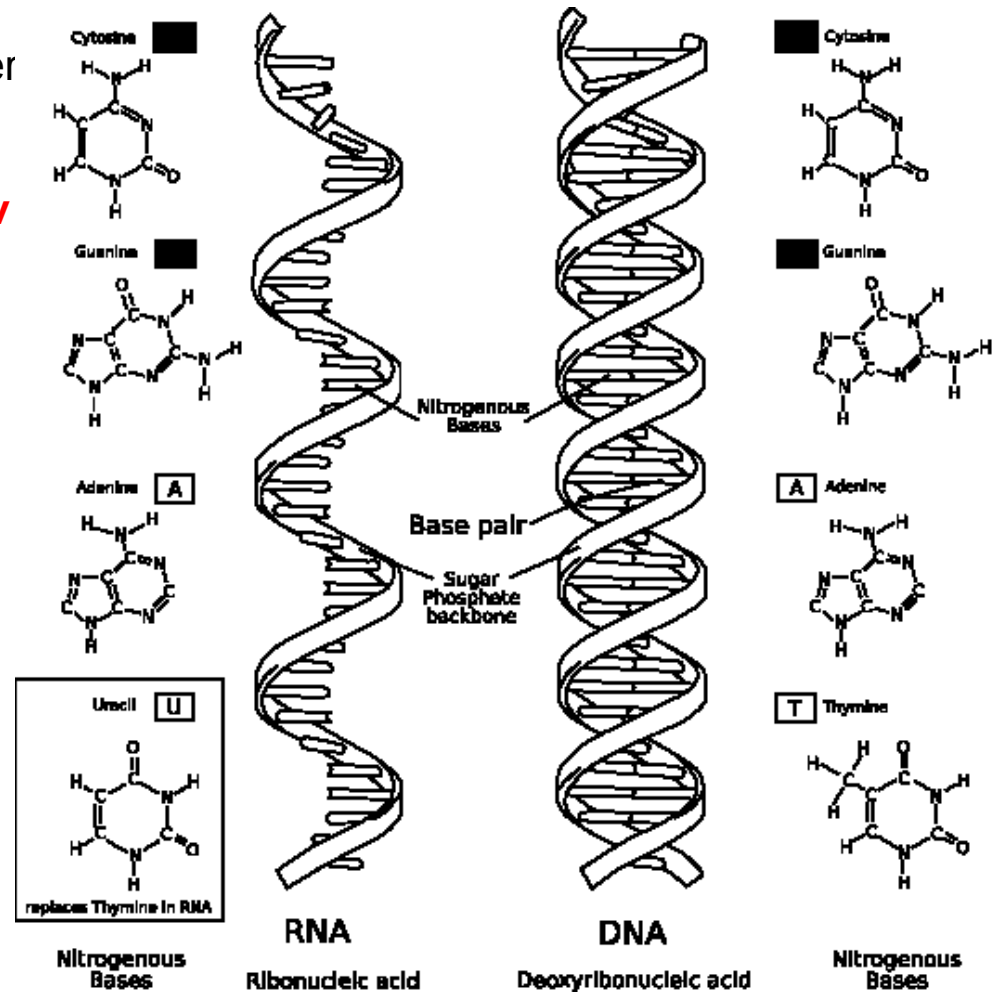
Izolace nukleových kyselin (NK)

Mgr. Veronika Tanhäuserová

- DNA byla poprvé vyizlována v roce 1869 Friedrichem Miescherem z jader buňek hnisu
- získat DNA/RNA v **nativním stavu, v dostatečné čistotě a množství**
- výběr metody purifikace závisí na způsobu její následné analýzy

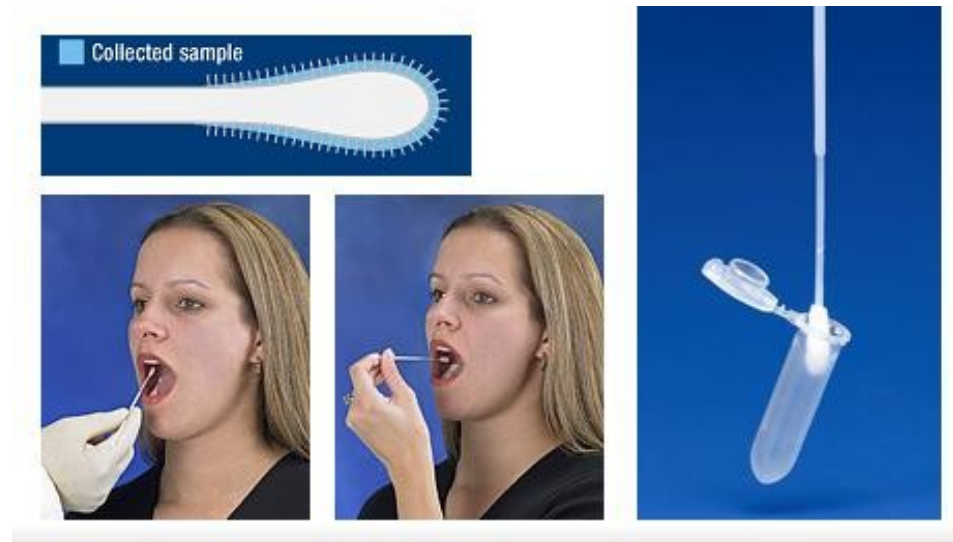


Friedrich Miescher



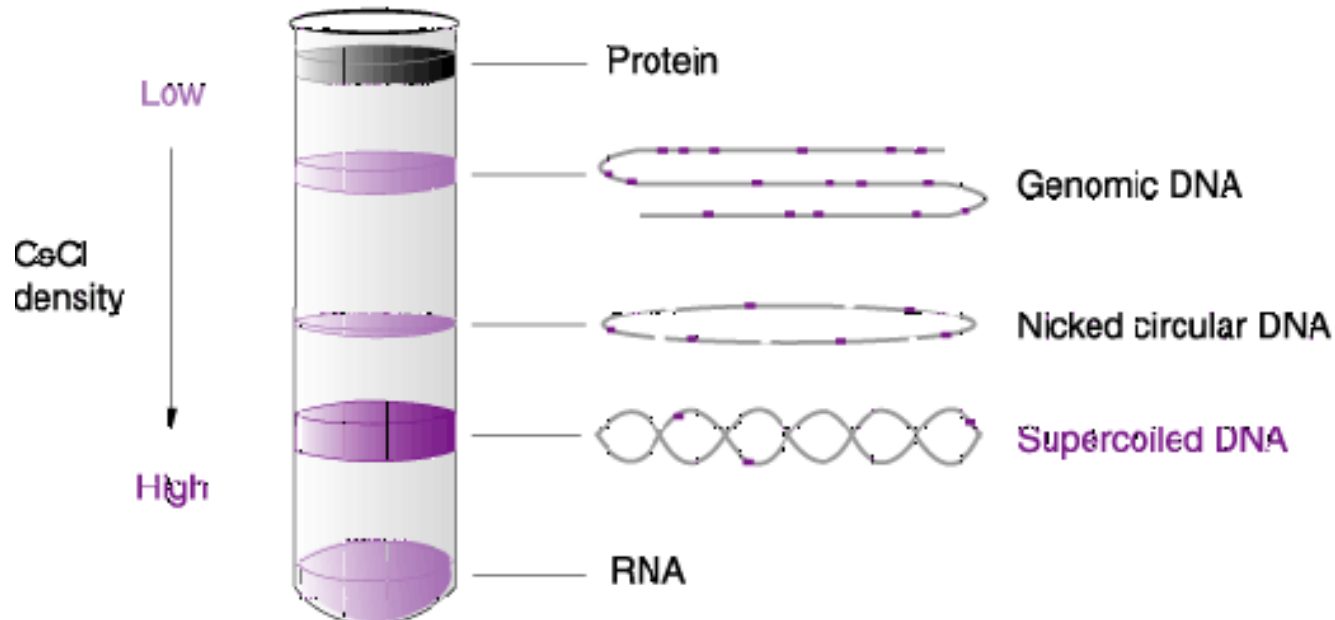
Materiál pro izolaci NK

- jednotlivé buňky
 - prokaryotické organizmy
 - kvasinky
- virové částice
- tkáně a orgány eukaryot
 - mechanická a/nebo enzymatická homogenizace
- materiál používaný k izolaci NK u člověka
 - leukocyty periferní krve
 - buňky bukové sliznice
 - amniové buňky
 - choriové klky
 - buňky vlasových kořínků
 - spermie
 - epitelální buňky pokožky
 - uvolněné buňky v tělních sekretech
 - aj.



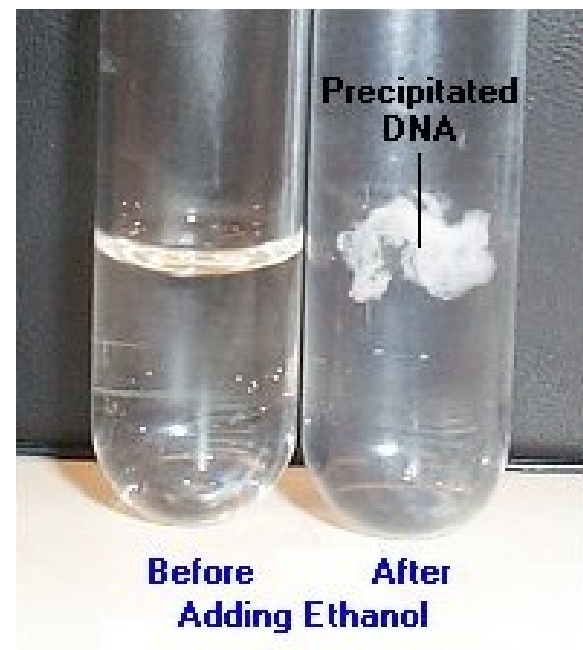
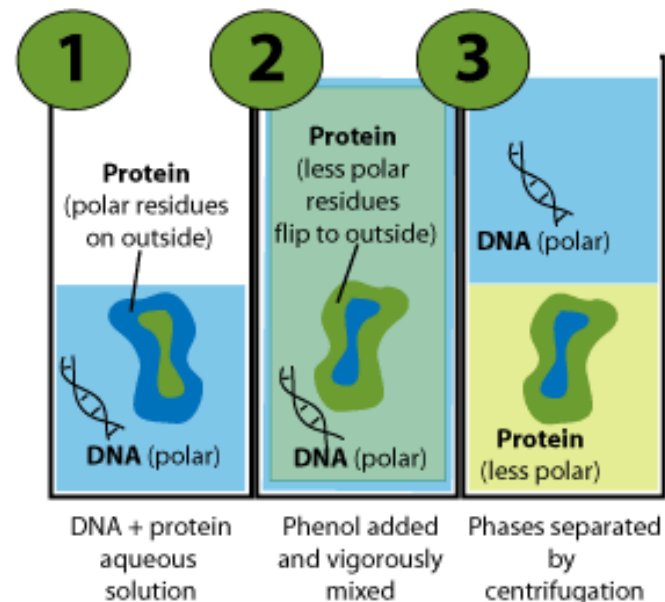
Typy metod izolace NK

- metody využívající rozdílnou rozpustnost biologického materiálu
 - fenol-chloroformová extrakce
 - ethanolová (isopropanolová)precipitace
- adsorpce na pevný podklad
 - vazba NK na křemičité sklo v přítomnosti chaotropních solí (NaI, guanidin thiokyanát, guanidin hydrochlorid)
- ultracentrifugace v hustotním gradientu
 - gradient CsCl



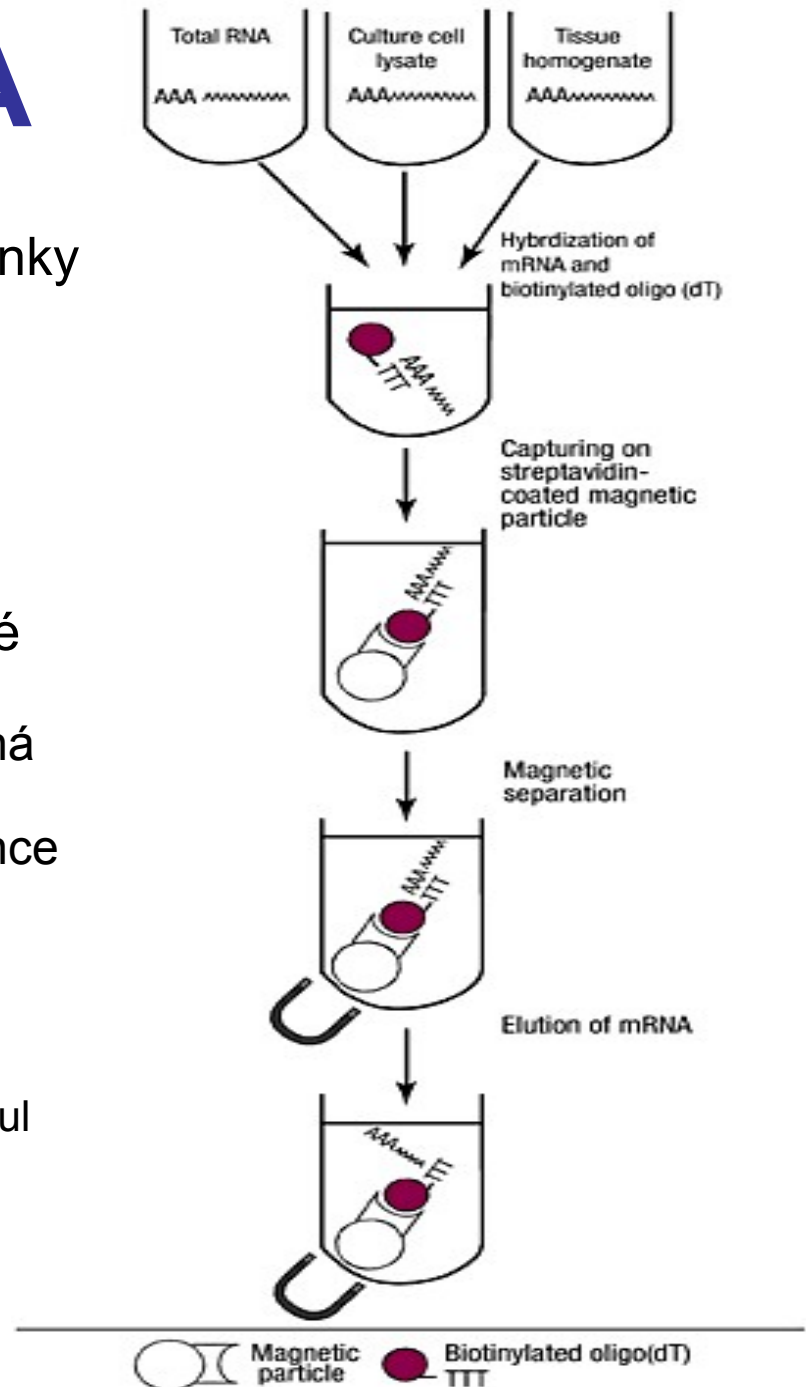
Izolace DNA v naší laboratoři

- sliny
- periferní krev
 - odběr do chelatačního roztoku (EDTA)
 - zabránění srážení krve a degradaci DNA DNázami
 - 1-5 dní při teplotě 4°C
 - dlouhodobě v zamraženém stavu
- lýza buněk
- odstranění membránových lipidů
 - detergenty
- odstranění proteinů
 - proteináza K
 - fenol-chloroformová extrakce
 - směs fenol-chloroform denaturuje proteiny a rozpouští lipidy
 - po centrifugaci
 - ve spodní organické fázi - směs fenol-chloroformu, proteinů a tuků
 - v horní vodné fázi - rozpuštěná DNA (molekula DNA je díky vysoce nabitě fosfátové kostře polární a tudíž rozpustná ve vodě)
- vysrážení DNA
 - isopropanolová precipitace za přítomnosti kladně nabitých iontů
 - kladně nabitě ionty neutralizují negativně nabitě fosfáty DNA
- odstranění zbytků solí
 - 70% ethanol
- vysušení
- rozpuštění v slabě alkalickém pufru



Izolace RNA

- náročnější, vyžaduje přísnější podmínky
 - molekuly RNA jsou mnohem méně stabilní než molekuly DNA
 - voda upravená inhibitory RNáz, homogenizace tkáně za přítomnosti antioxidantních látek,...
- mRNA tvoří pouze malý podíl celkové RNA
 - tradiční metody izolace NK a následná separace na mRNA, rRNA a tRNA
 - metody využívající afinitu poly(A) konce mRNA a oligo(dT) sondy značené biotinem
 - imobilizace hybridní molekuly biotinylované dT-A mRNA na nosiči (streptavidinem pokryté magnetické kuličky) a odmytí nežádoucích molekul

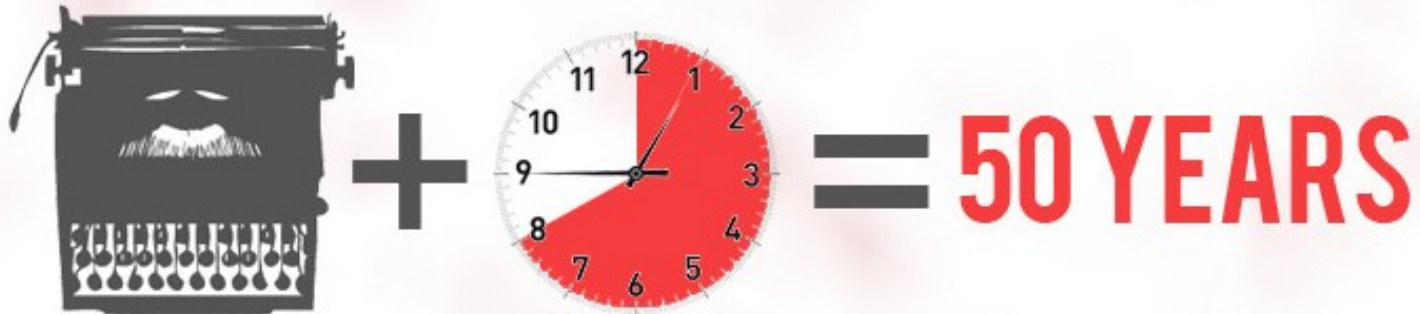
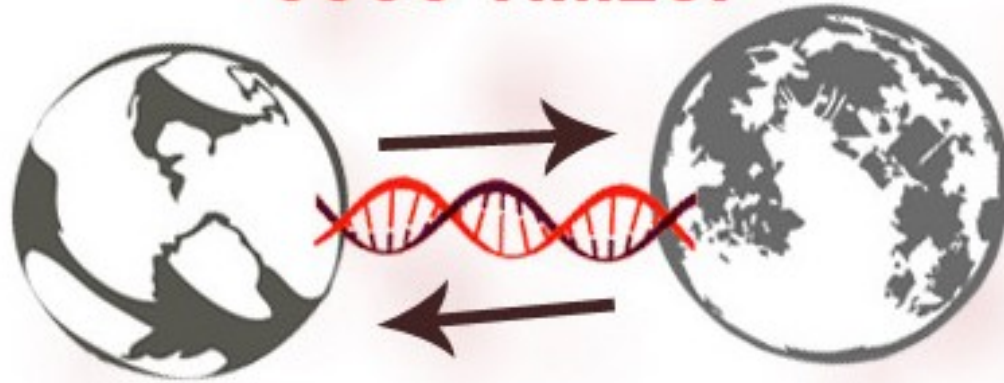


Detekce a kvantifikace NK

- spektrofotometrická metoda
 - pro měření dostatečně čistých vzorků
 - odhad koncentrace měřením absorbance
 - NK absorbují UV záření s maximem absorbance při vlnové délce 260nm
 - $A_{260} = 1,0$ odpovídá asi 50 $\mu\text{g/ml}$ DNA nebo 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA
 - stupeň čistoty NK se stanovuje z poměru A_{260}/A_{280}
 - proteiny absorbují UV záření s maximem absorbance při vlnové délce 280nm
 - $A_{260}/A_{280} = 1,8$ čistá DNA
 - $A_{260}/A_{280} = 2,0$ čistá RNA
 - $A_{260}/A_{280} < 1,75$ kontaminace bílkovinami
- fluorescenční metoda
 - pro měření vzorků s nízkou koncentrací či znečištěných
 - interkalace etidymbromidu mezi báze NK, detekce fluorescence po ozáření UV světlem a srovnání s intenzitou fluorescence standardu o známé koncentraci



IF YOU UNWRAP ALL OF THE DNA YOU HAVE IN
ALL YOUR CELLS, YOU COULD REACH THE MOON
6000 TIMES.



It would take a person typing 60 words per minute, 8 hours a day,
around 50 years to type the human genome.

Real time PCR

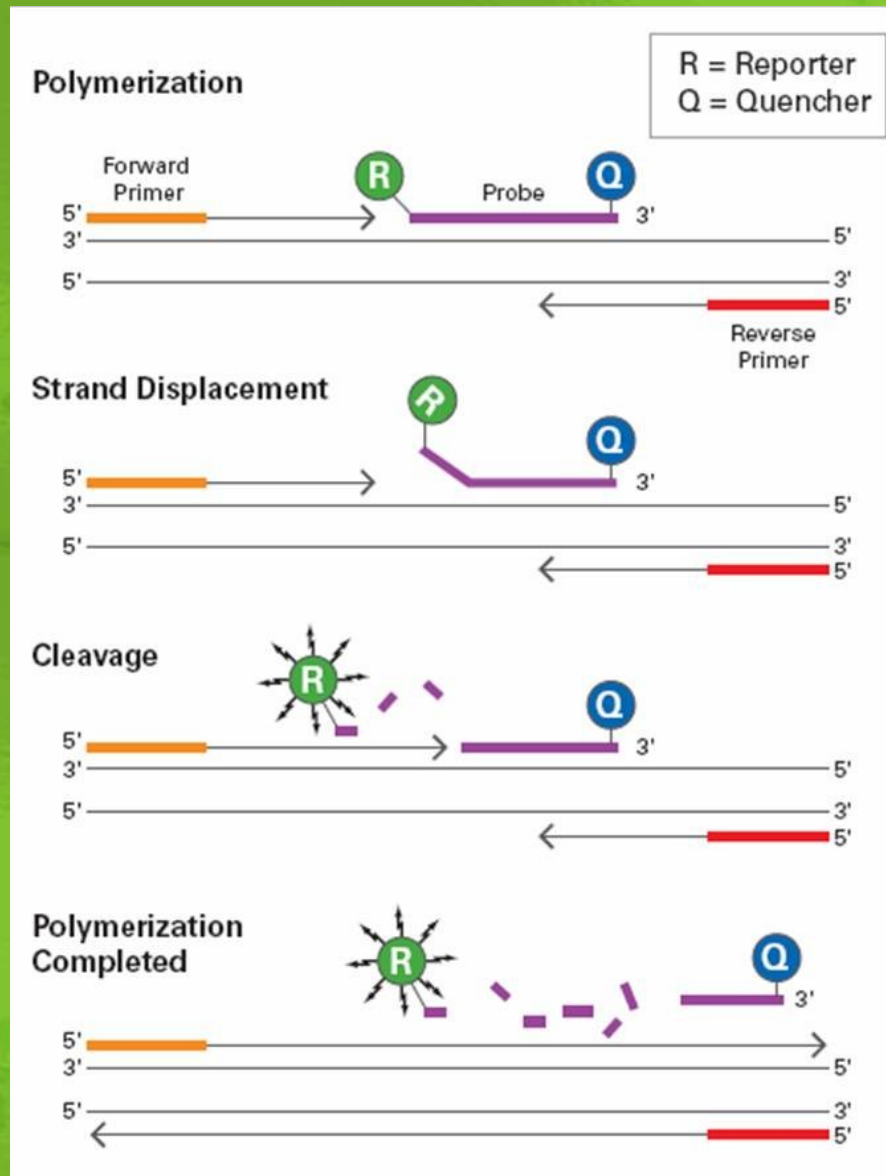
Mgr. Marián Hlavna

- DNA
 - genotypizácia (kvantifikácia alel)
 - genotypizovanie (SNP)
 - určovanie druhov, SNP, kvantifikácia (HRM)
- RNA
 - kvantifikácia transkriptu

Taqman sondy

Interkalačná fluorescenčná farbička (SybrGreen)

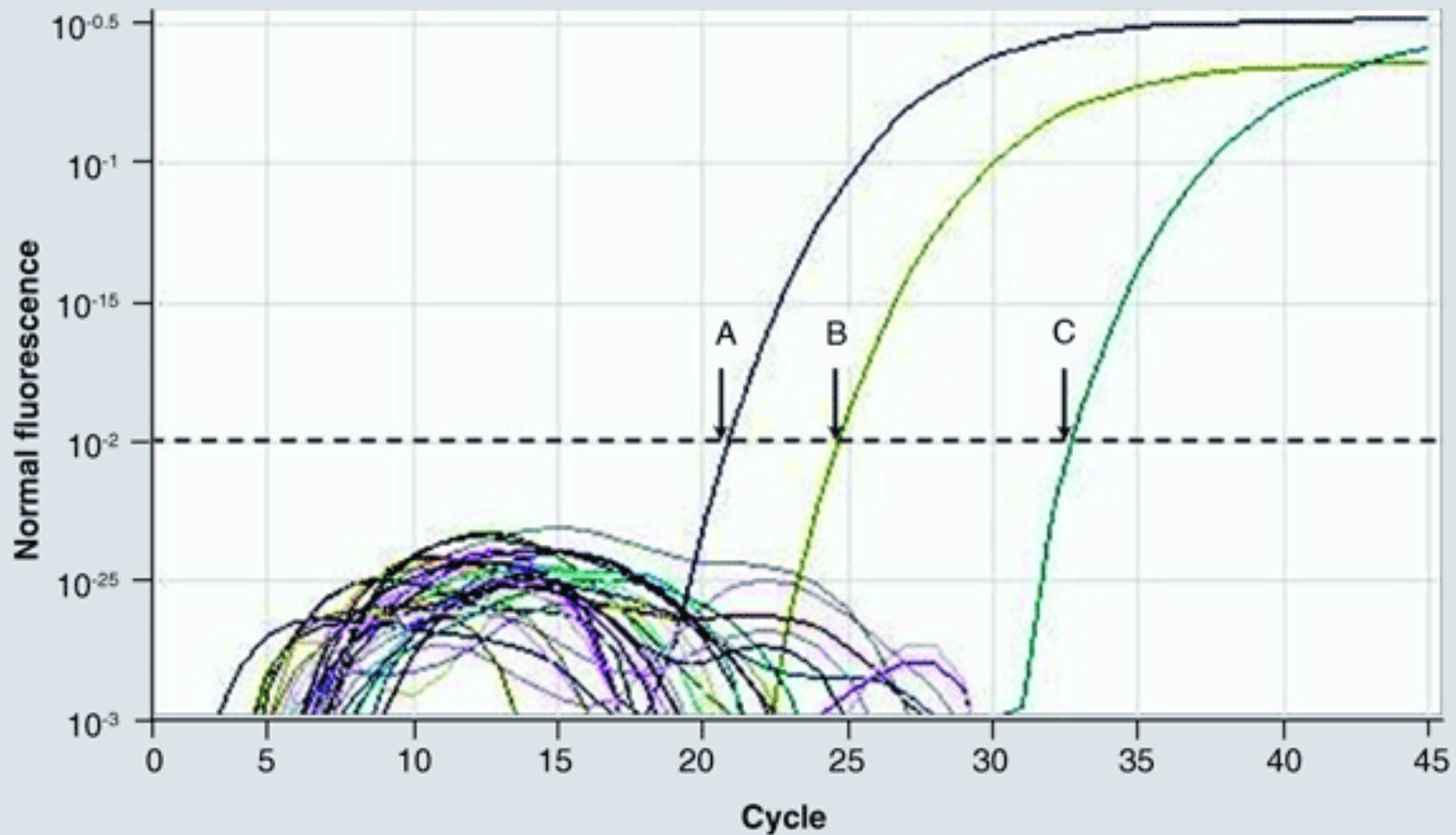
Real time PCR princíp Taqman sond



Real time PCR – kvantifikácia DNA, RNA

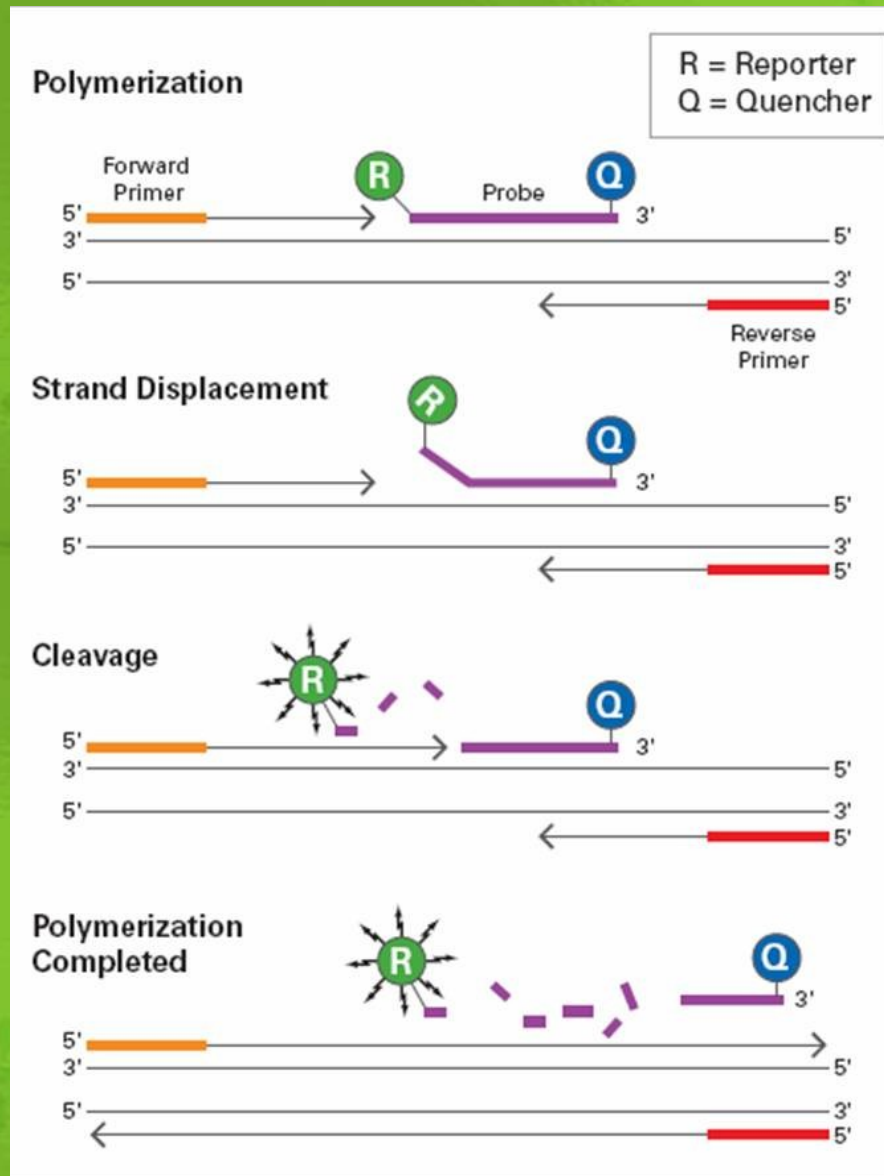
Medscape®

www.medscape.com

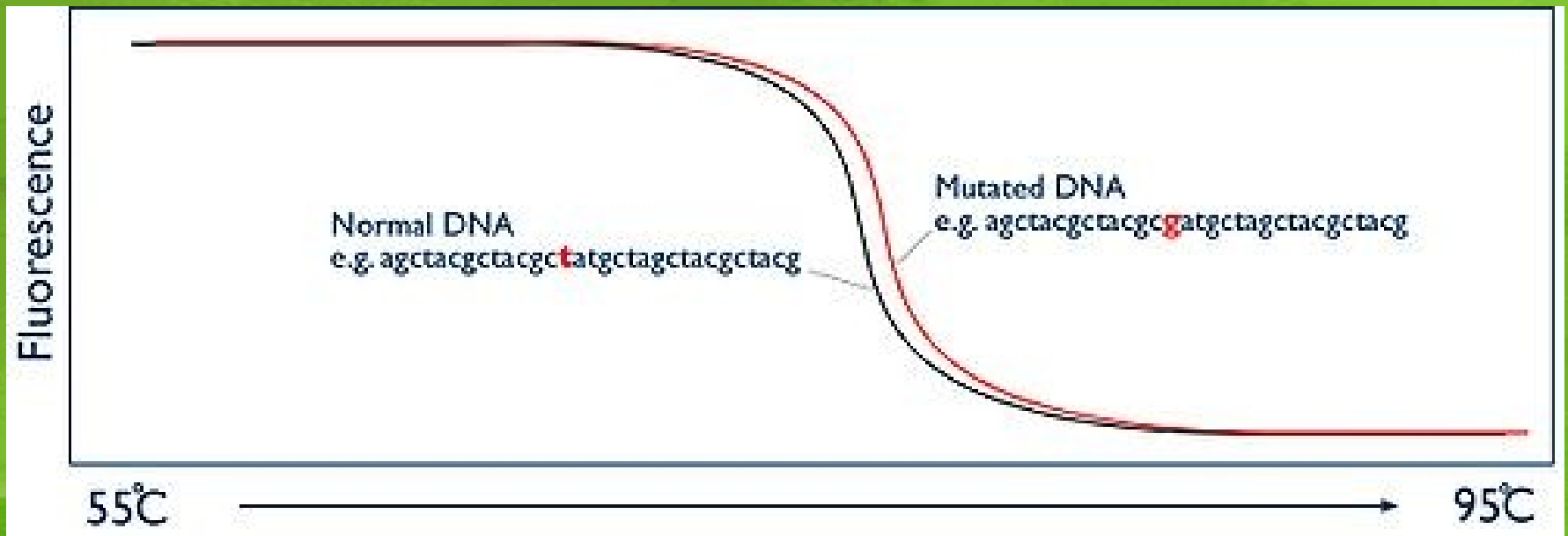


Source: Future Virol © 2008 Future Medicine Ltd

Real time PCR genotypizácia SNP



Real time PCR (HRM)



SEKVENACE

Mgr. Jolana Lipková

Historie-Watson a Crick 1953



Využití

- Diagnostika chorob a časné zjištění náchylnosti jedince k určitým nemocem (rakovina, kariovaskulární onemocnění), genová terapie
- Celogenomové sekvenování (evoluční biologie)
- Fylogenetika (evoluční vývoj) organizmů
- Antropologie: srovnávání DNA k zjišťování migrací lidských ras (zejména podle mitochondriální DNA a Y-chromozomální DNA)
- Forezní vědy: důkaz viny či nevinu v zločinu, určení otcovství a podobně – mikrosatelity (test paternity)
- Zemědělství: geneticky modifikované plodiny

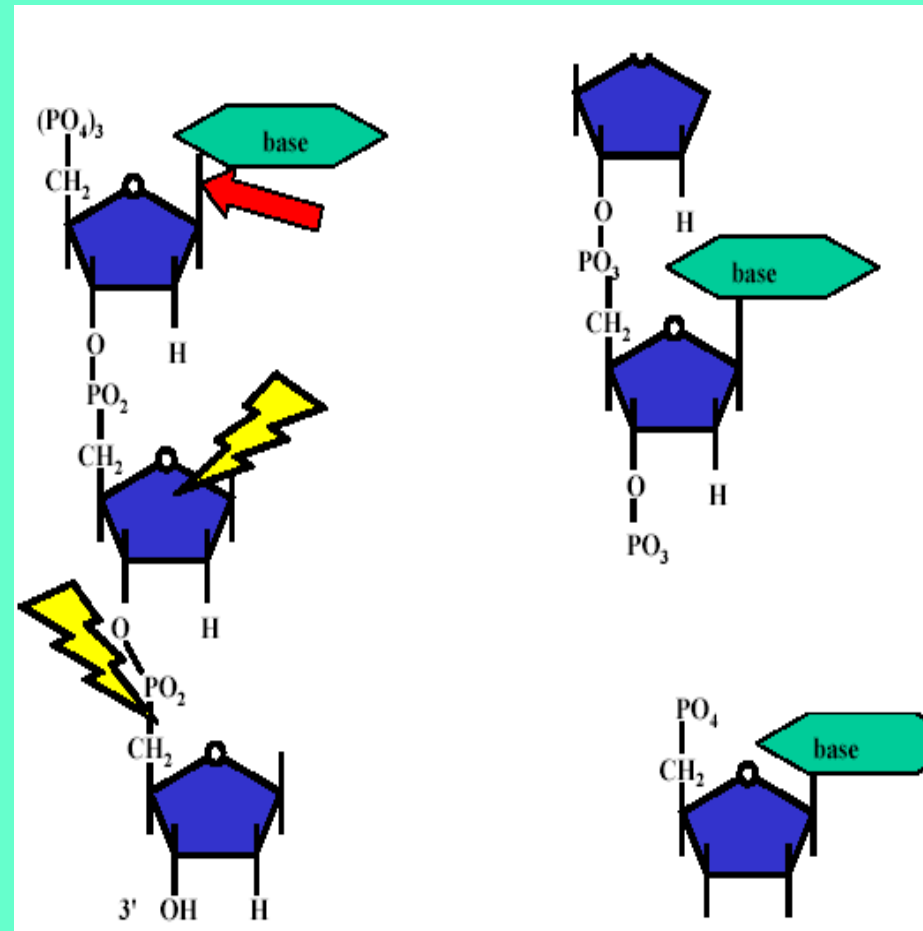
Dvě principiálně odlišné metody

- Chemická – štěpení zkoumané molekuly v místě modifikace
- Enzymatická – amplifikace krátkých fragmentů očekávané délky

Chemická metoda- Maxam-Gilbert

Postup:

1. Příprava značené jednořetězcové DNA, jejíž sekvence má být stanovena
2. Rozdělení vzorku DNA do 4 částí
3. Chemická modifikace jednoho nebo bazí v náhodných místech
4. Štěpení molekuly DNA v místech, kde došlo k modifikaci bazí
5. Elektroforéza fragmentů DNA
6. Autoradiografická (nebo jiná) detekce fragmentů DNA



5'- GATCAGG - 3'
3'- C TAGTCC - 5'

↓ *koncové značení a separace řetězců*

³²P-GATCAGG - 3'

↓

4 reakce

modifikace bází

DMS

k. mravenčí

hydrazin

hydrazin + NaCl

↓

↓

↓

↓

Piperidin

štěpení

G

A+G

T+C

C

↓

↓

↓

↓

P-GATCAG
P-GATCAGG

P-GA
P-GATCA
P-GATCAG
P-GATCAGG

P-GAT
P-GATC

P-GATC

↙

↙

↙

↙

G

A+G

T+C

C



G
G
A
C
T
A

*elektroforéza
autoradiografie*

Enzymatická metoda -Sanger

Reakční směs:

DNA templát

primer

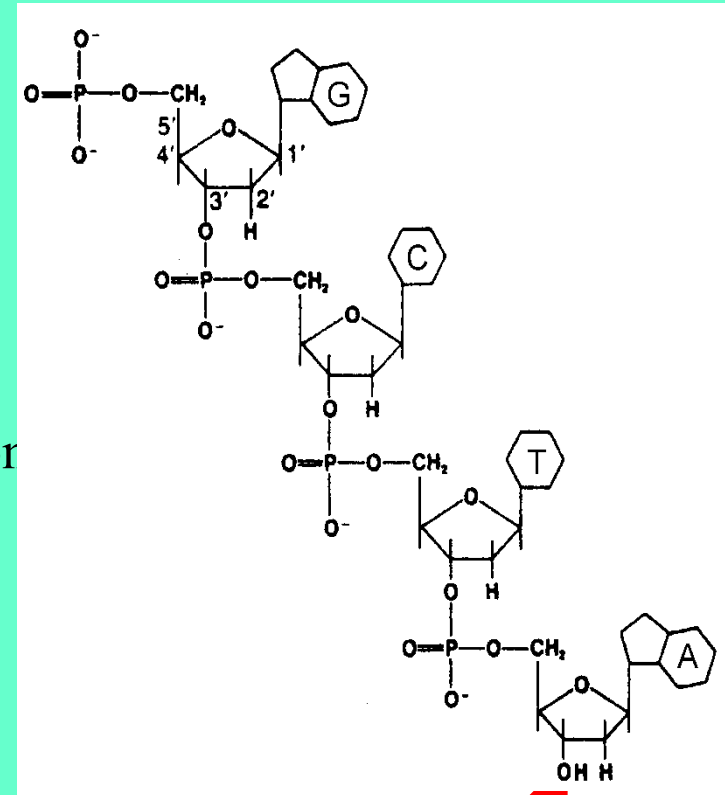
ddNTP-fluorescenčně značen

dNTP (100x více než ddNTP)

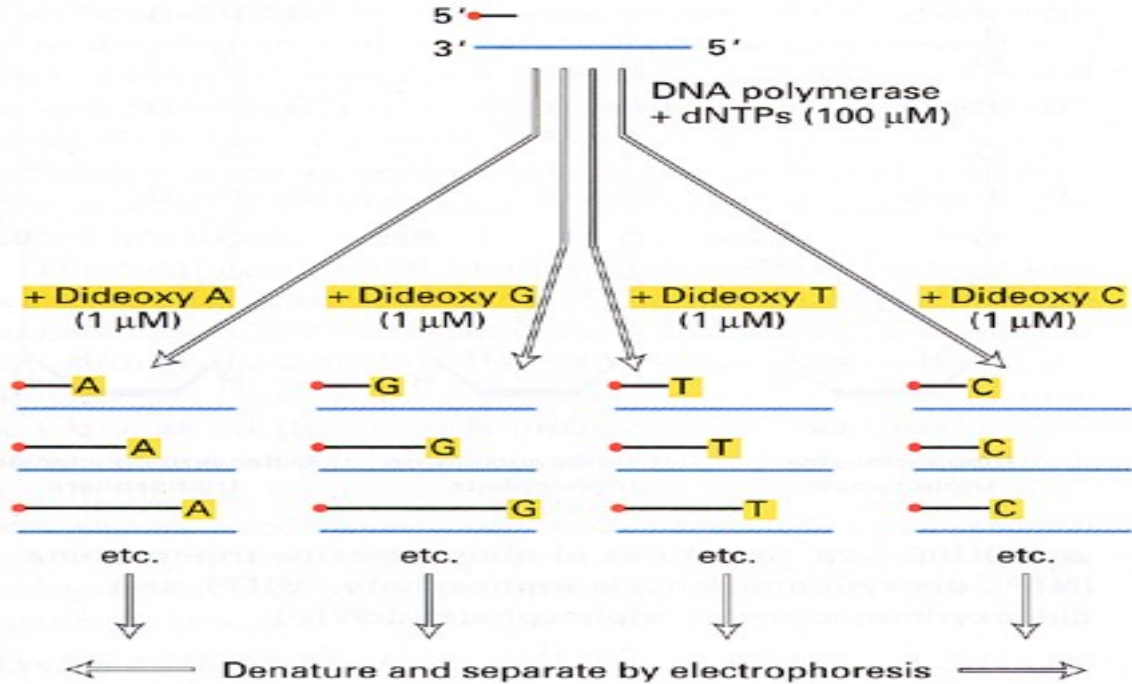
Taq DNA polymeráza

Pufr

- Soubor ssDNA s fluorescenčně definovaným koncem lišících se o jednu bázi
- Rozdělení elektroforézou
- Vyhodnocení



H

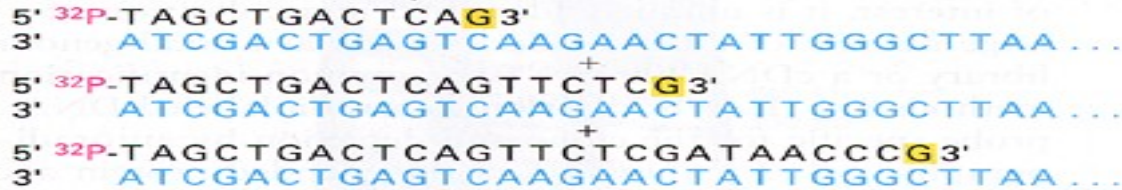


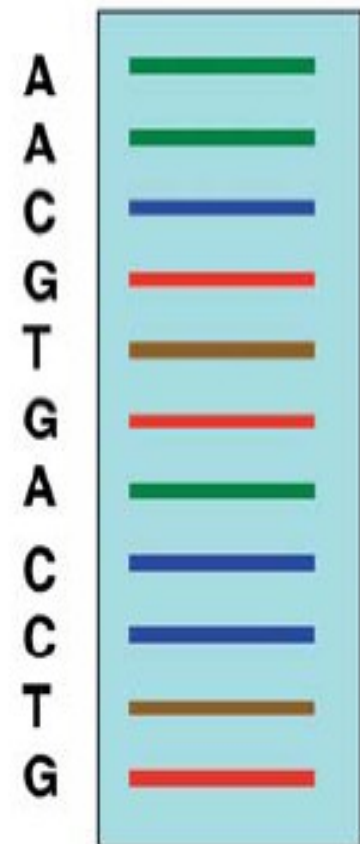
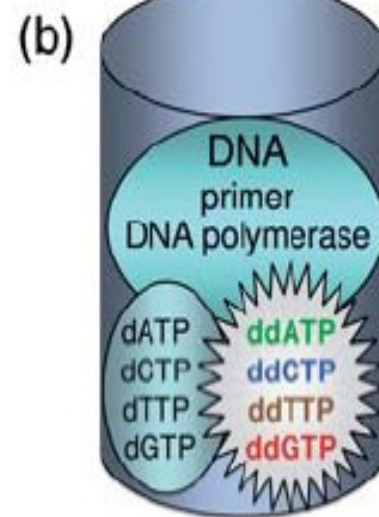
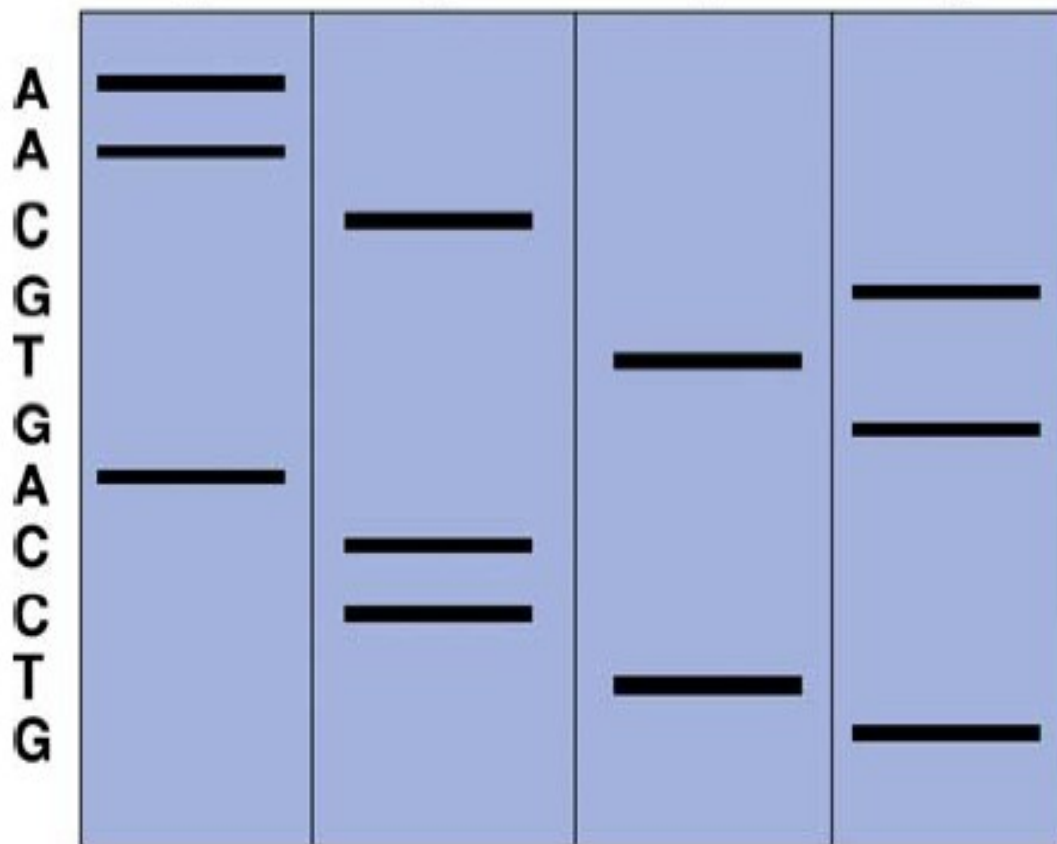
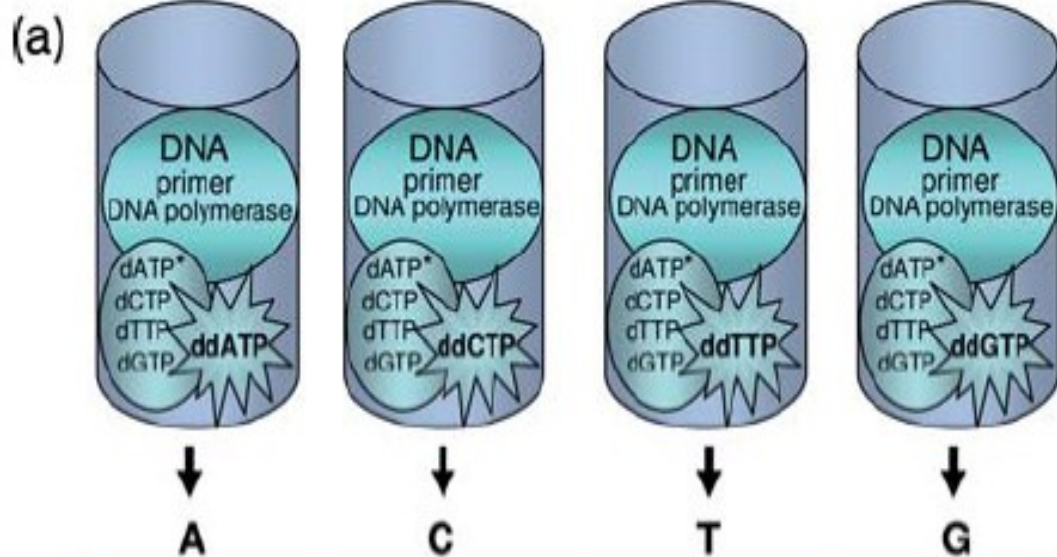
C A G T C G A T

(b)



DNA polymerase
+ dATP, dGTP, dCTP, dTTP
+ ddGTP in low concentration





Automatické sekvenování

C

T

A

G



GT C G A G C A T A T A

Vyhodnocení

BioEdit Sequence Alignment Editor

File Edit View Zoom Horizontal Scale Accessory Application RNA Window Help



ABI Chromatogram: C:\Documents and Settings\denni\Plocha\jolana\sekvenace\pokusJolana1+oapk_AgRp\5F_

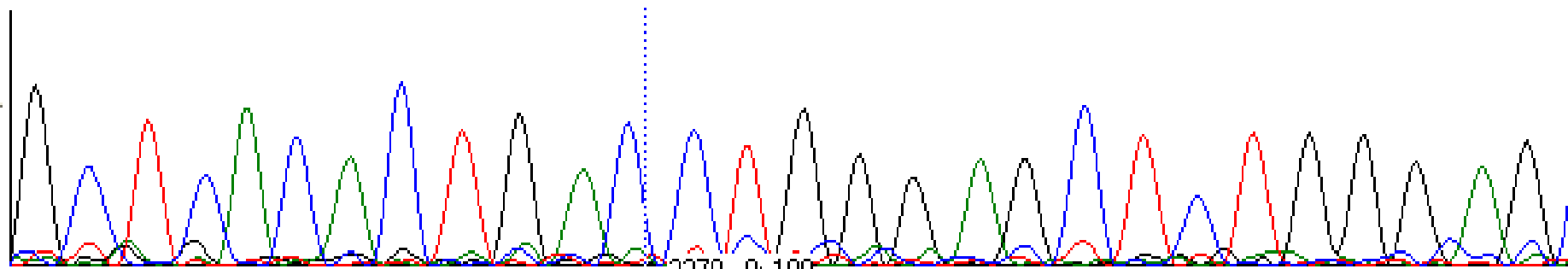


Selected: none

Sample: SF

File: C:\Documents and Settings\denni\Plocha\jolana\sekvenace\pokusJolana1+oapk_AgRp\5F_2009-

180 190 200
G C T C A C A C T G A C C T G G G A G C T C T G G G A G



Buněčné kultury

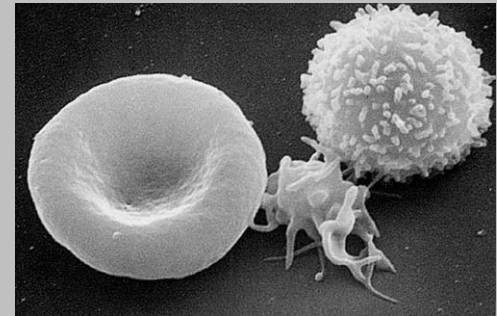
Mgr. Katarína Kuricová

Buněčná kultura je **system, kde jsou in vitro kultivované buňky** prokaryotické, eukaryotické či rostlinné za zvláštních specifických podmínek.

Většina buněčných linií má omezenou životnost (stárnutí, zástava dělení). Jen některé kultury jsou nesmrtelné = permanentní linie (nádorové, imortalizované).

Buňky podle způsobu kultivace:

- a) adherentní (rostou přichycené k podkladu)
- b) suspenzní (volně se vznášejí v médiu)



Není známa metoda kultivace buněk jater, nervů a ledvin, epitelu tvoří jednovrstevné kolonie, fibroblasty můžou tvořit až 3 vrstevné.

Práce s buněčnými kulturami

... spočívá v zajištění optimálních podmínek pro přežívání a růst kultivovaných buněk.

Obecně má práce s buněčnou kulturou tři fáze:

1. izolace buněčného kmene
2. udržování buněčné linie a její expanze
3. využití namnožených buněk v pokusu



Potřeba regulace fyzikálních, chemických a biologických faktorů:

- teplota (optimální pro organismus původu)
- média (ionty, pH, osmolarita, sacharidy)
- sérum
- kontaminace (antibiotika + monitoring)

