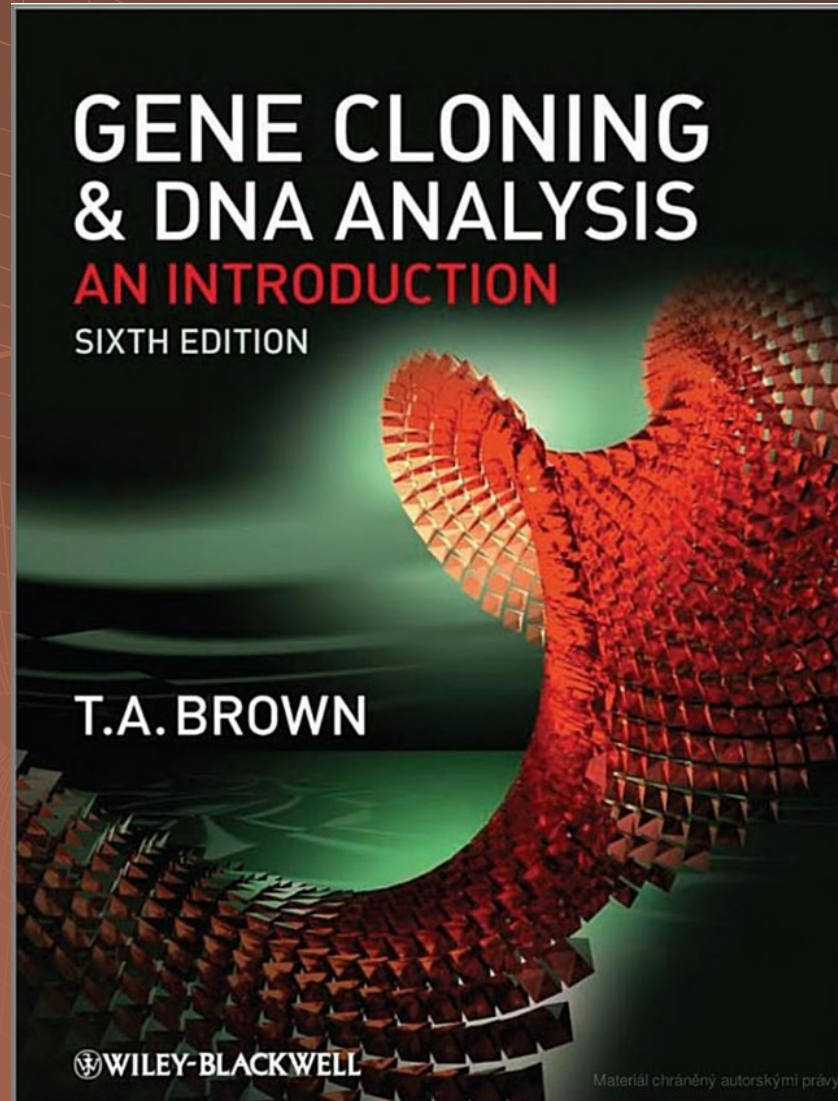


Analýza a separace nukleových kyselin

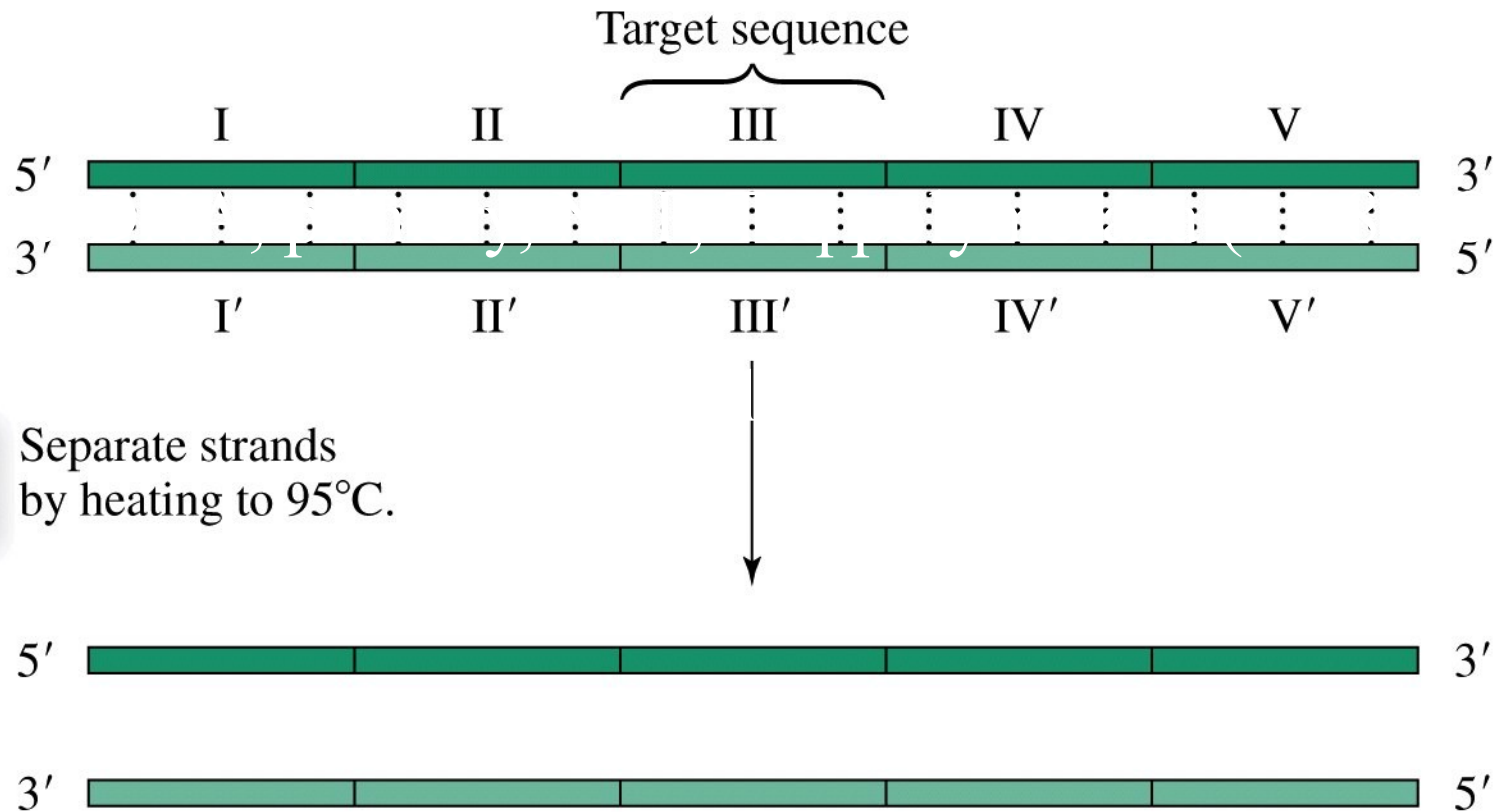


INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Literatura

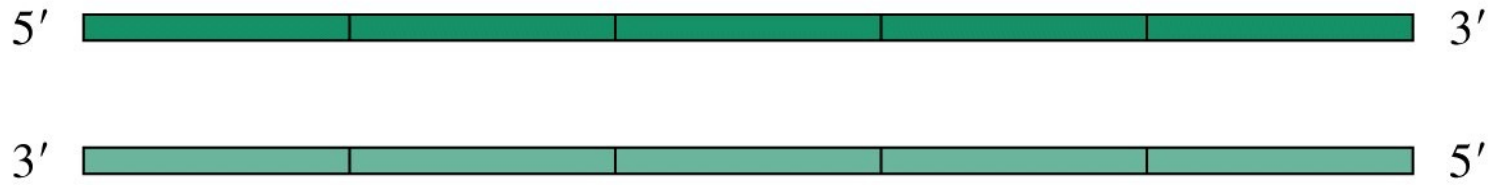


PCR Mullis 1983 NC 1993



Step 1

Separate strands
by heating to 95°C.



Step 2

Hybridize primers by cooling to 50°C.

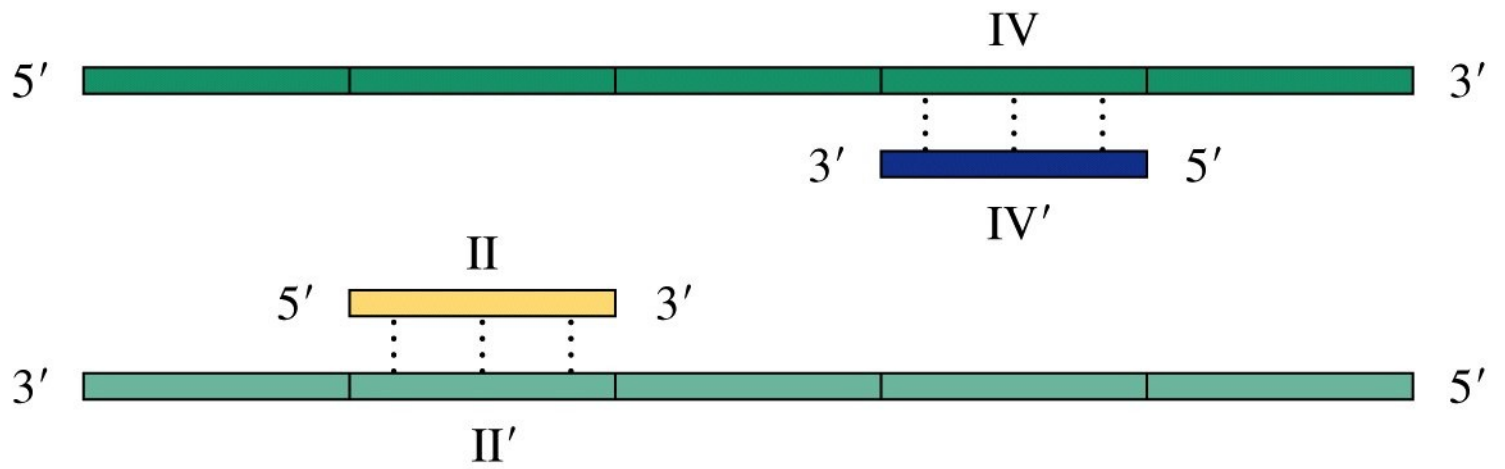
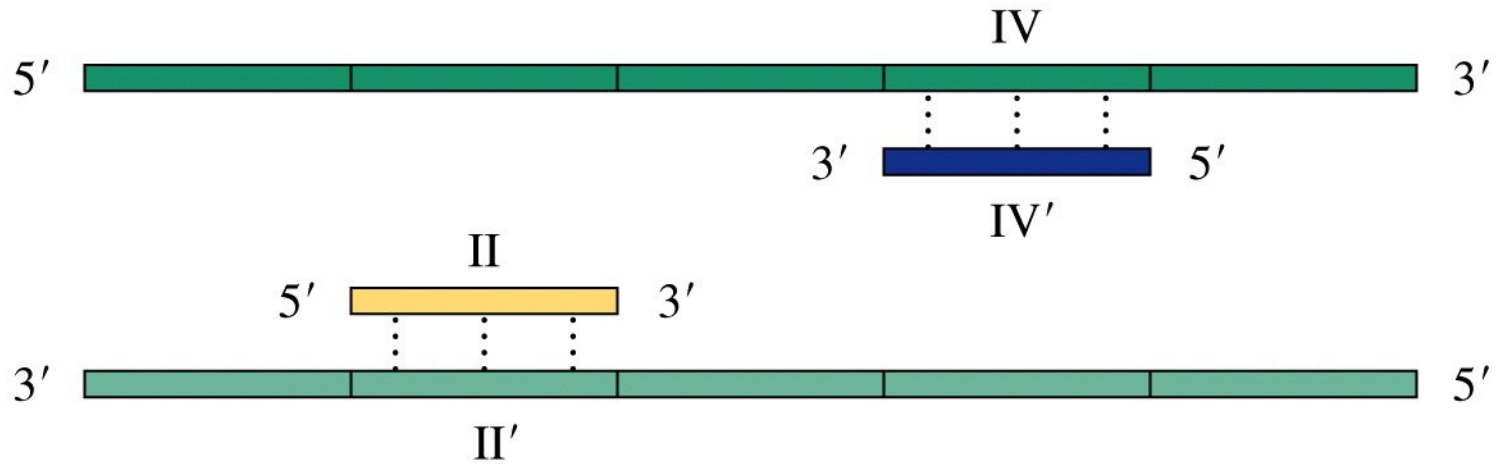


Figure 13-11 part 2 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons



Step 3

DNA is synthesized by extending the primers at 72°C.

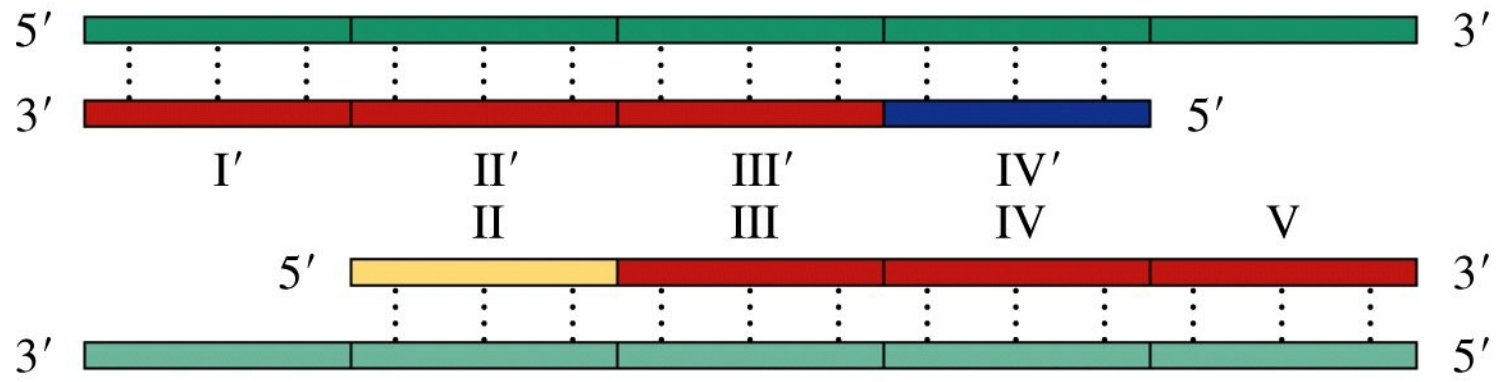
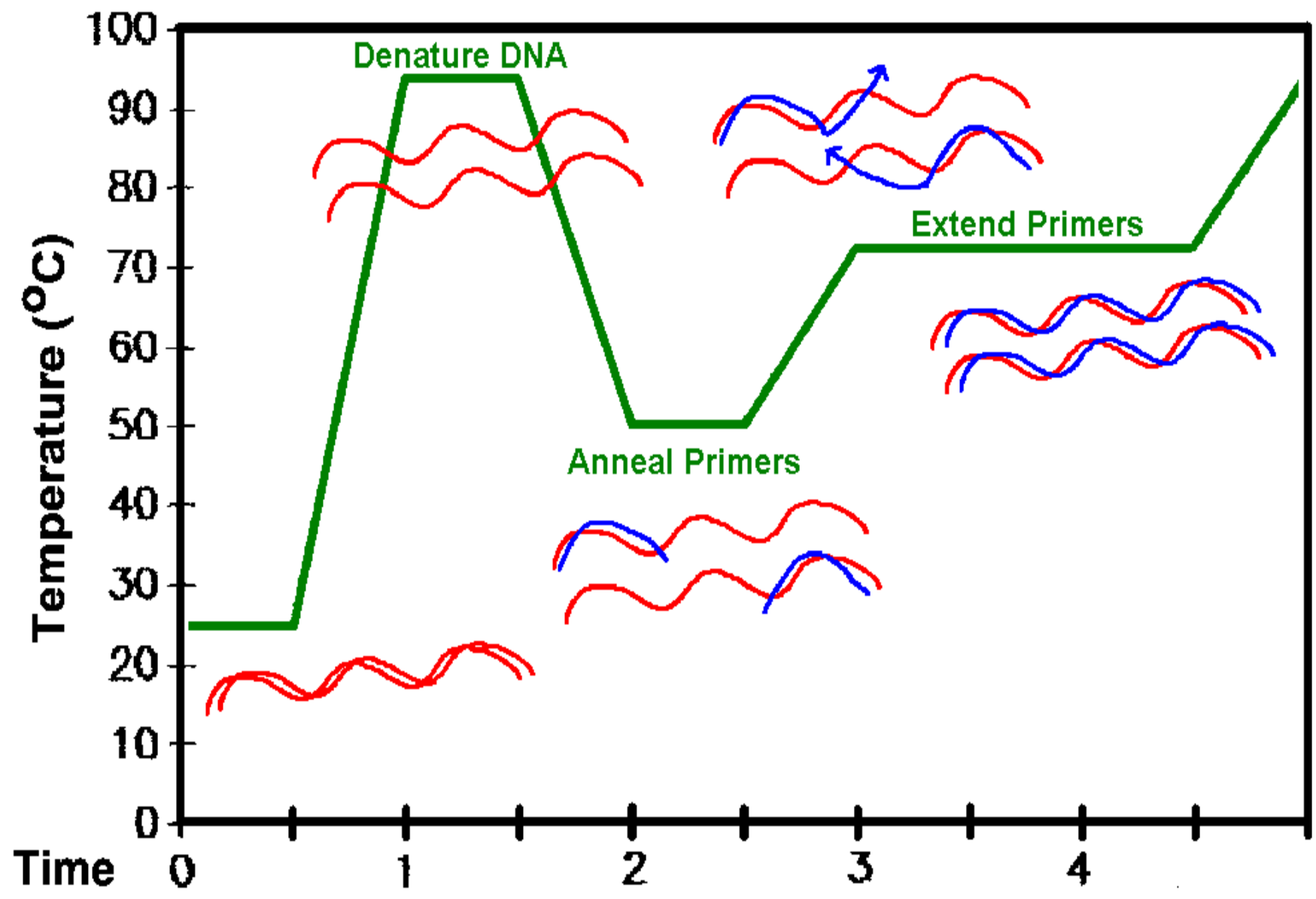
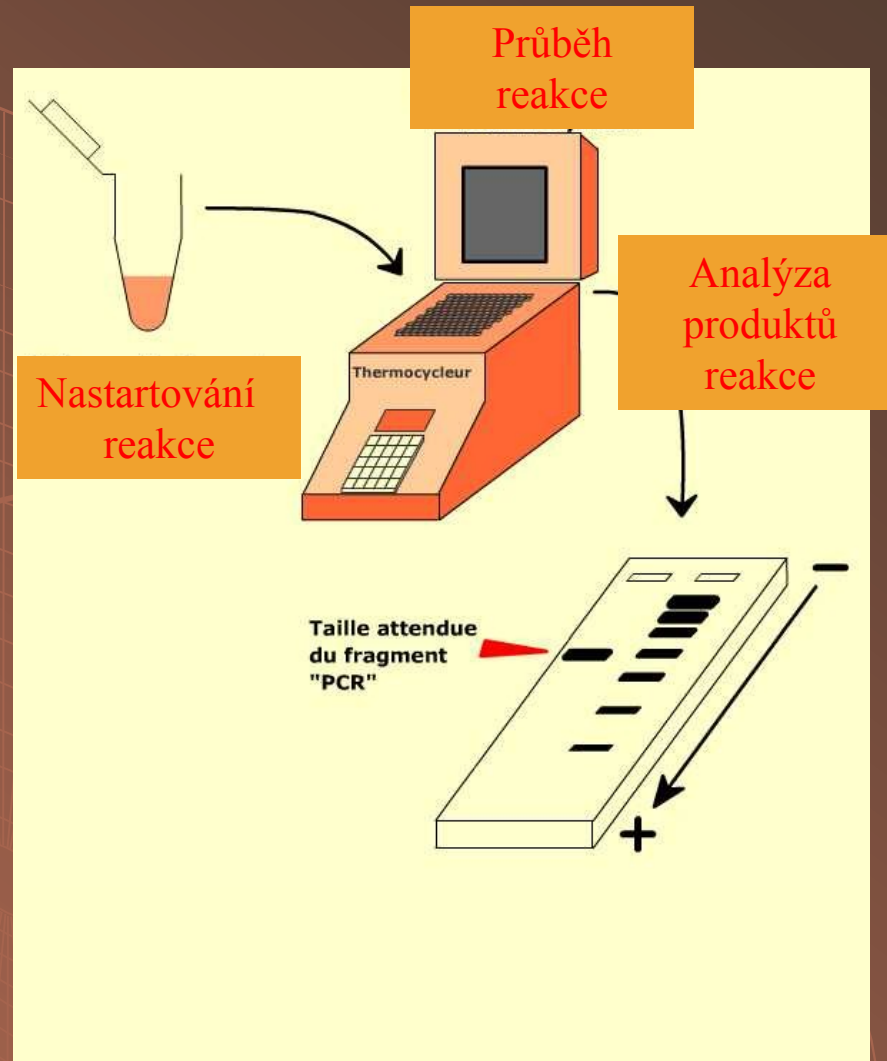


Figure 13-11 part 3 Concepts in Biochemistry, 3/e
 © 2006 John Wiley & Sons





Thermocycler



Real time PCR

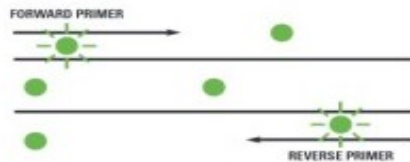
1. Navázání: SYBR® Green I se váže během každého cyklu na dvouvláknovou DNA.



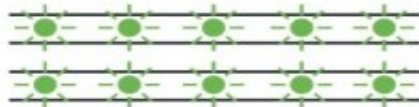
2. Denaturace: Ve fázi denaturace DNA je SYBR® Green I uvolněn z vazby na DNA a celková fluorescence dramaticky klesá.



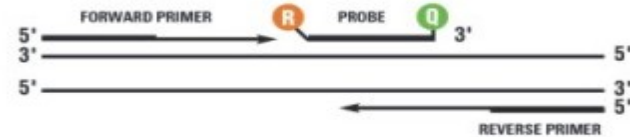
3. Polymerizace: Během annealingu primerů a elongace řetězce se Sybr Green opět začíná navazovat na vznikající dvouvláknovou DNA - fluorescence stoupá.



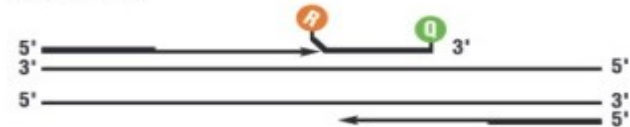
4. Ukončení polymerizace: Emitovaná fluorescence dosahuje maxima.



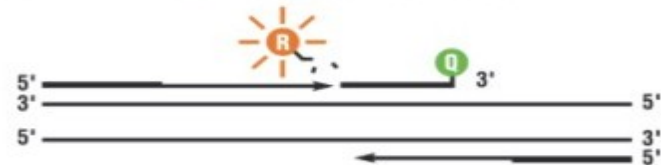
1. Polymerizace: Fluorescenční substrát (reporter - R) a jeho zhášeč (Q) jsou navázány na 5' a 3' konce TaqMan sondy.



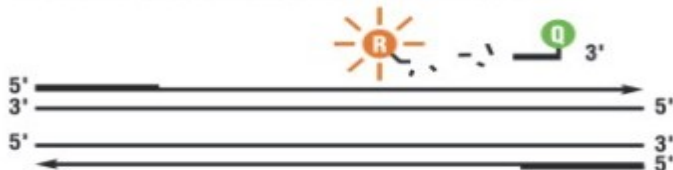
2. Elongace řetězce: Dokud je sonda intaktní záření emitované substrátem R je pohlcováno blízkým "zhášečem".



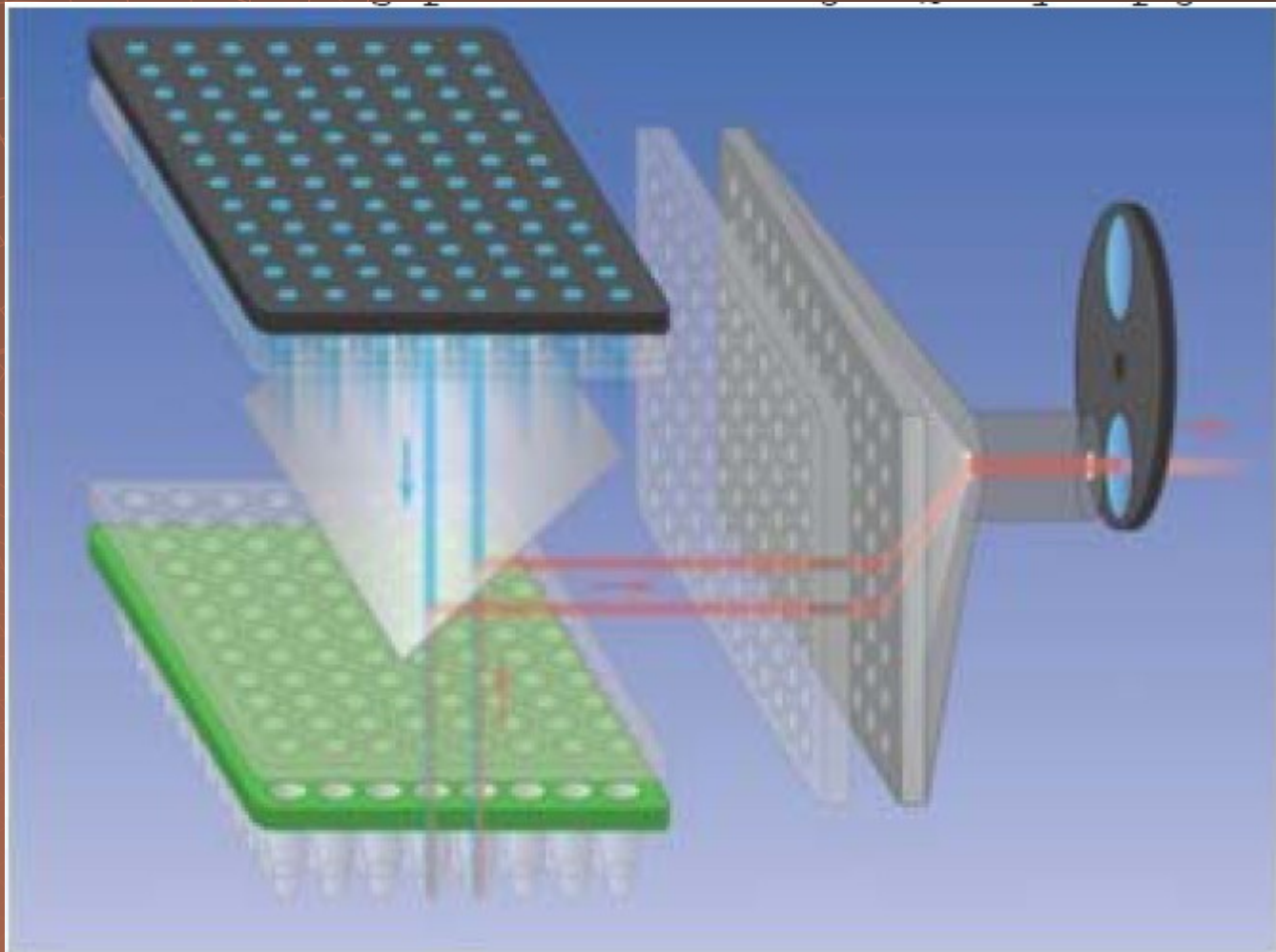
3. Odštěpení: když Taq polymeráza dorazí k začátku sondy, postupně ji odchlipuje až odštěpí fluorofor. Ten se tímto oddálí od zhášeče a emitované světlo přestane být pohlcováno - detekovaná fluorescence stoupá.



4. Polymerizace ukončena: reporterová barva oddělená od zhášeče emituje charakteristickou fluorescenci.

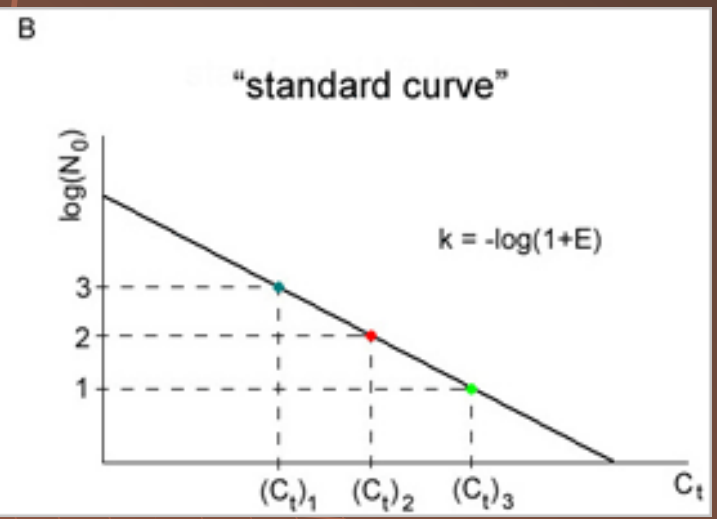
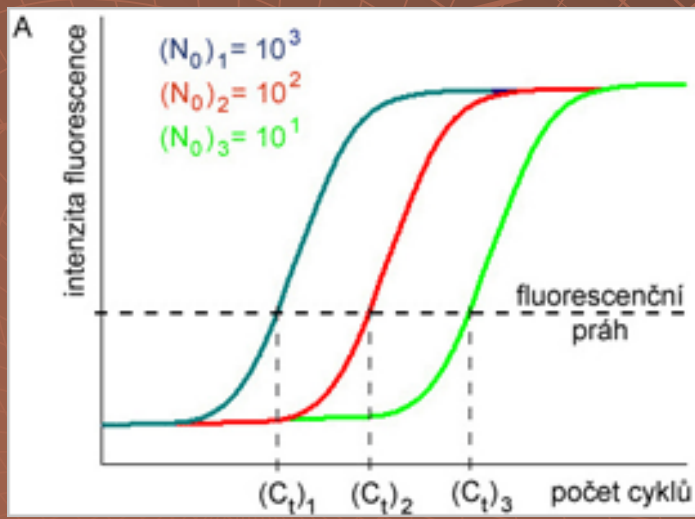


Real time PCR

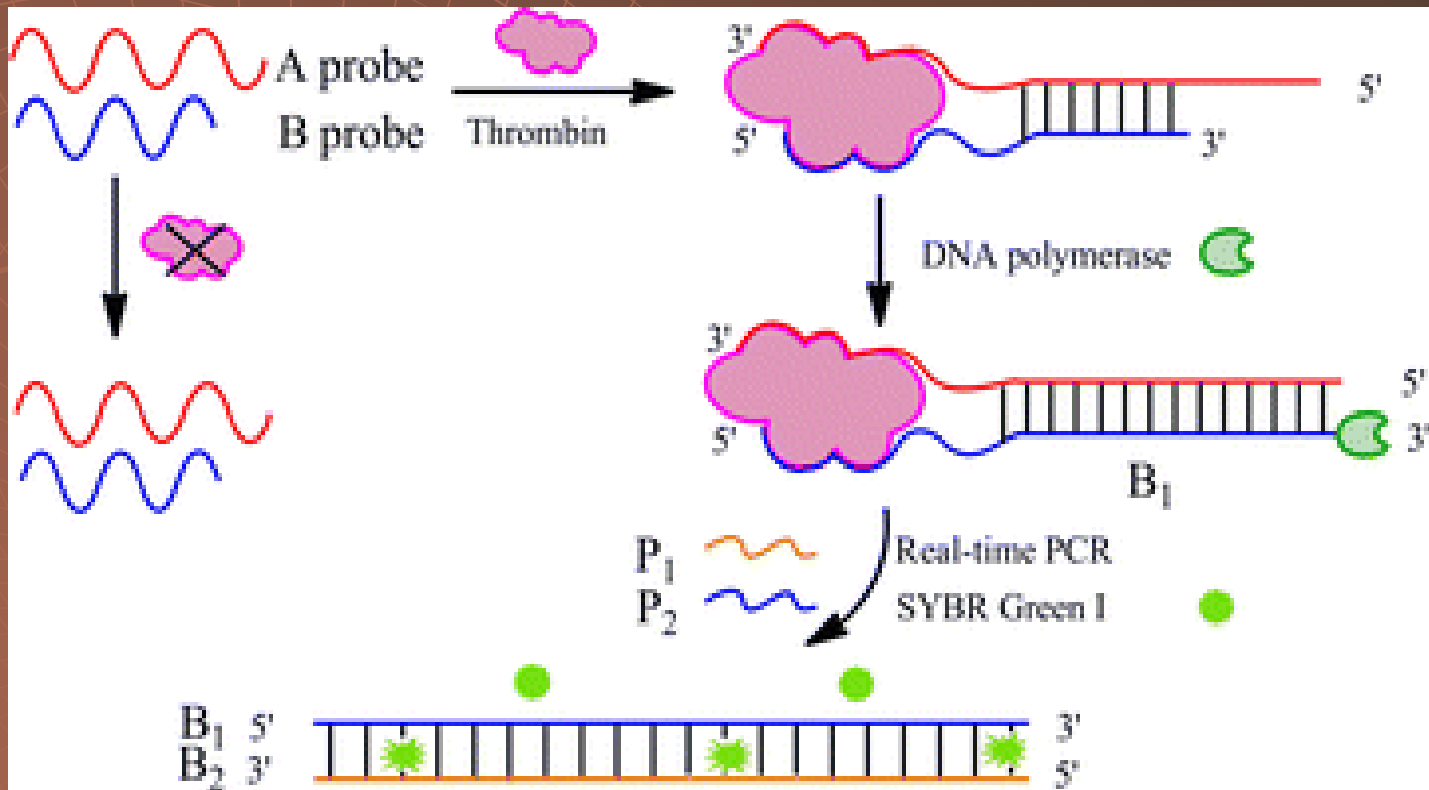


Real time PCR

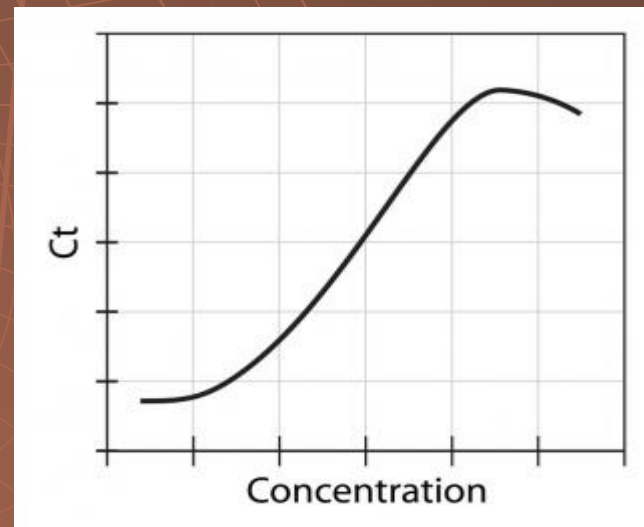
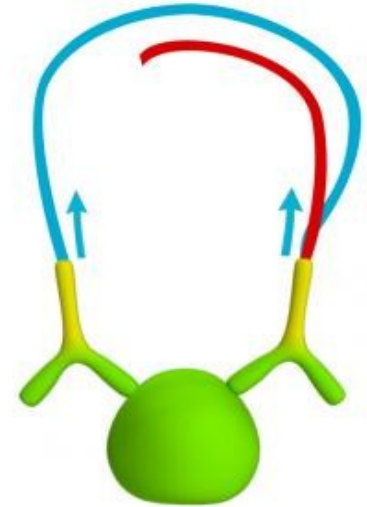
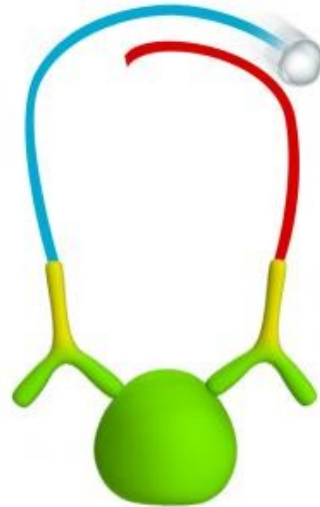
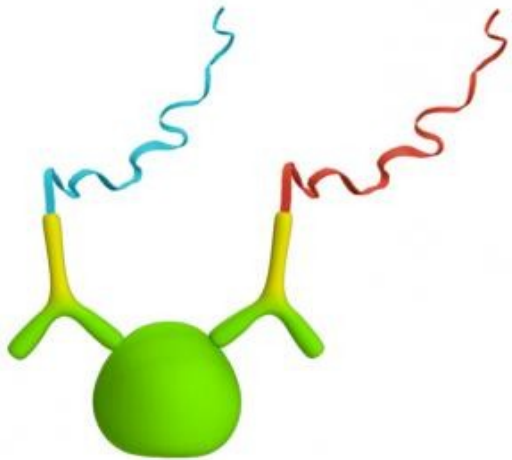




Real time PCR proteinů



Real time PCR proteinů



Stanovení sekvence DNA

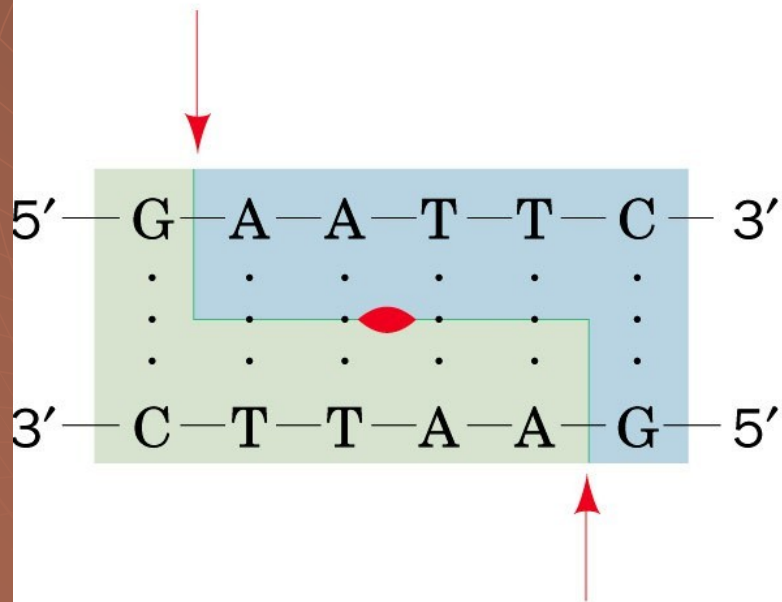
- ◆ Restrikční enzymy
- ◆ Chemické štěpení – Maxam Gilbertovo metoda
- ◆ Enzymová metoda
- ◆ Pyrosekvenování

Restrikční enzymy

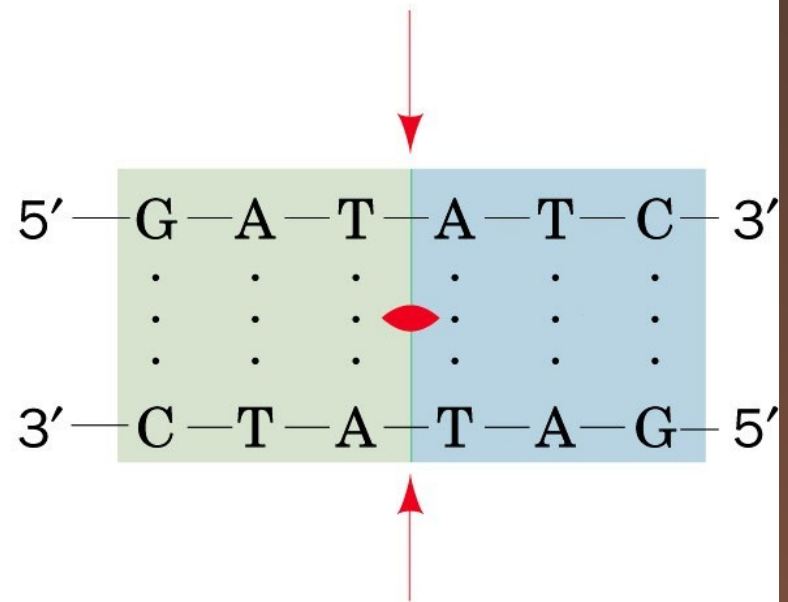
Enzyme	Recognition Sequence*	Microorganism
<i>AhaI</i>	AG↓C* ⁺ T	<i>Anthrobacter luteus</i>
<i>BamHI</i>	G↓GATC* ⁺ C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>BglI</i>	GCCNNNN↓NGCC	<i>Bacillus globigii</i>
<i>BglII</i>	A↓GATCT	<i>Bacillus globigii</i>
<i>EcoRI</i>	G↓AA* ⁺ TTC	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>EcoRII</i>	↓CC*(⁺)GG	<i>Escherichia coli</i> R245
<i>EcoRV</i>	GA* ⁺ ↓ATC	<i>Escherichia coli</i> J62 pLG74
<i>HaeII</i>	RGCGC↓Y	<i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>HaeIII</i>	GG↓C* ⁺ C	<i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>HindIII</i>	A* ⁺ ↓AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> R ₄
<i>HpaII</i>	C↓C* ⁺ GG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>MspI</i>	C* ⁺ ↓CGG	<i>Moraxella</i> species
<i>PstI</i>	CTGCA* ⁺ ↓G	<i>Providencia stuartii</i> 164
<i>PvuII</i>	CAG↓C* ⁺ TG	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>SalI</i>	G↓TCGAC	<i>Streptomyces albus</i> G
<i>TaqI</i>	T↓CGA* ⁺	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG	<i>Xanthomonas holcicola</i>

Restrikční enzymy

(a) *EcoRI*



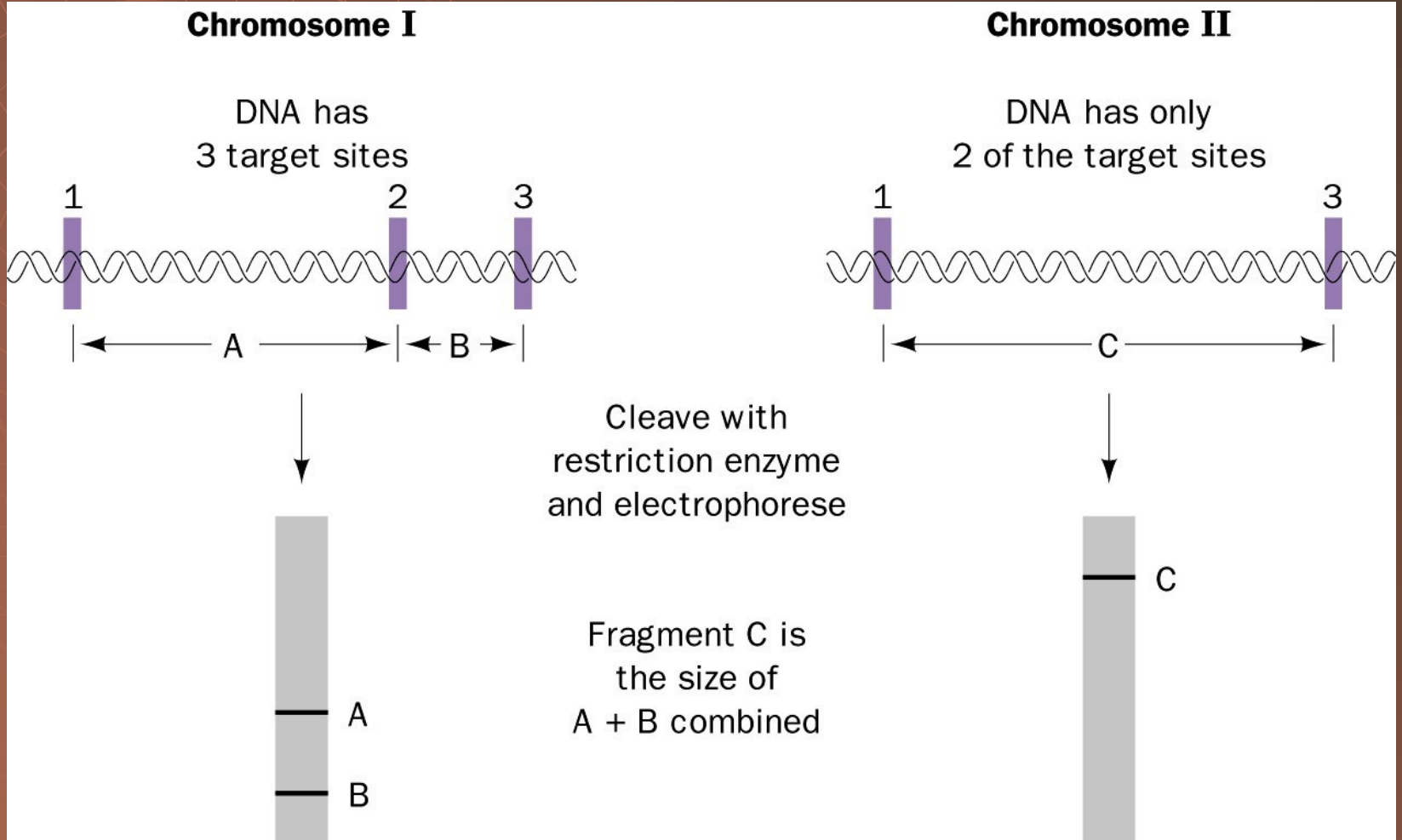
(b) *EcoRV*



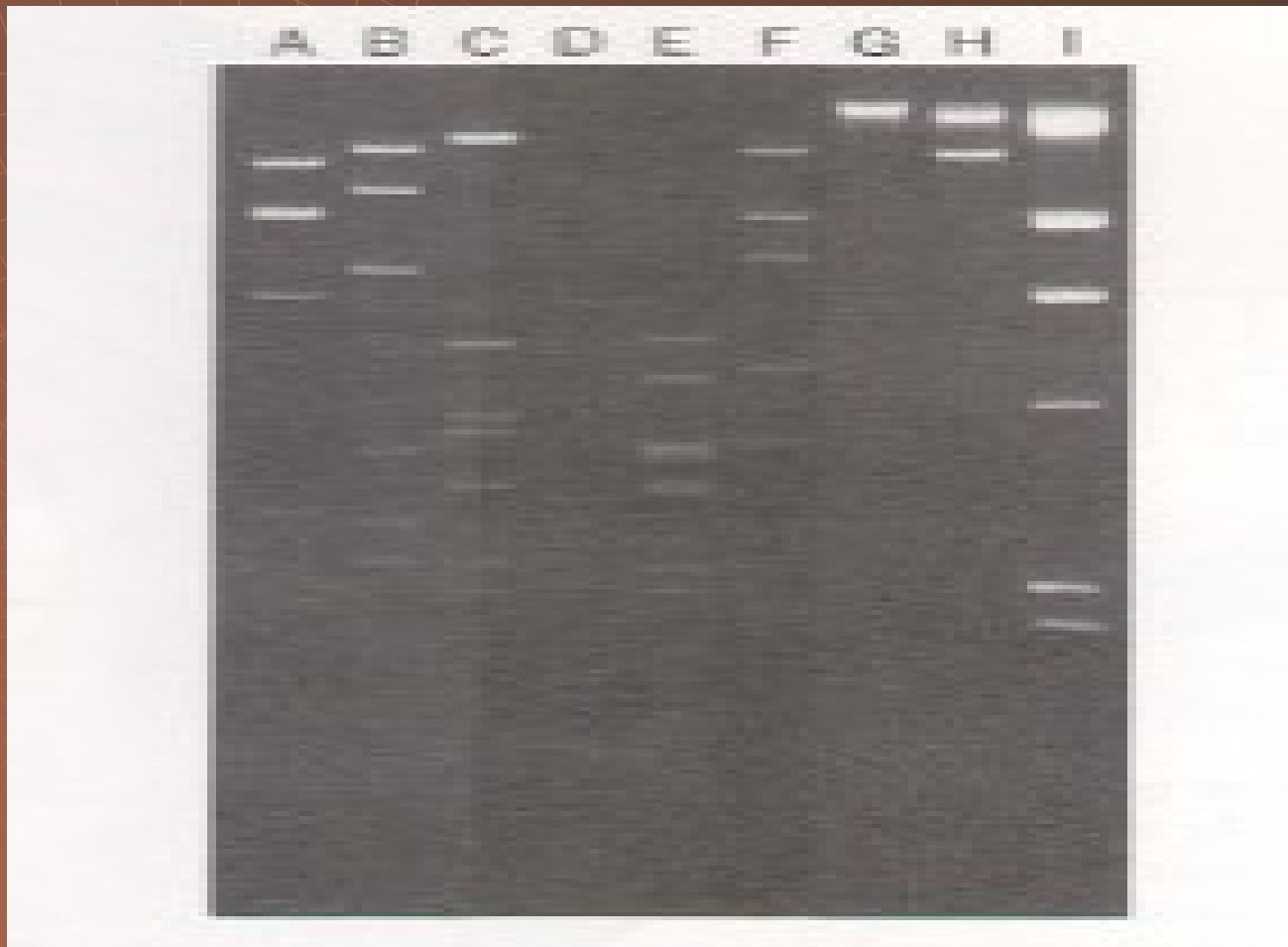
↓ Cleavage site

● Twofold symmetry axis

Restrikční enzymy



Restrikční enzymy

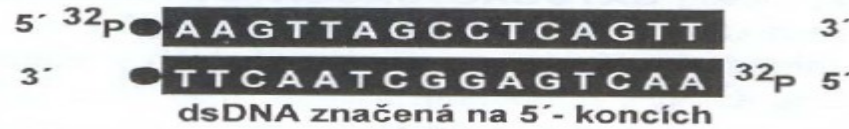


Maxam Gilbertova metoda

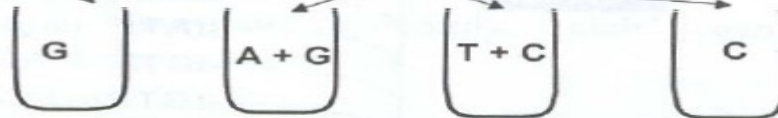
Maxam-Gilbertova metoda

- značení 5' konce ^{32}P
- specifické chemické štěpení
- elektroforéza

Maxam Gilbertova metoda

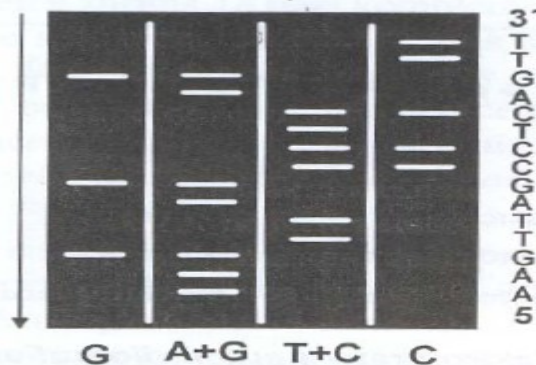


Separace řetězců.



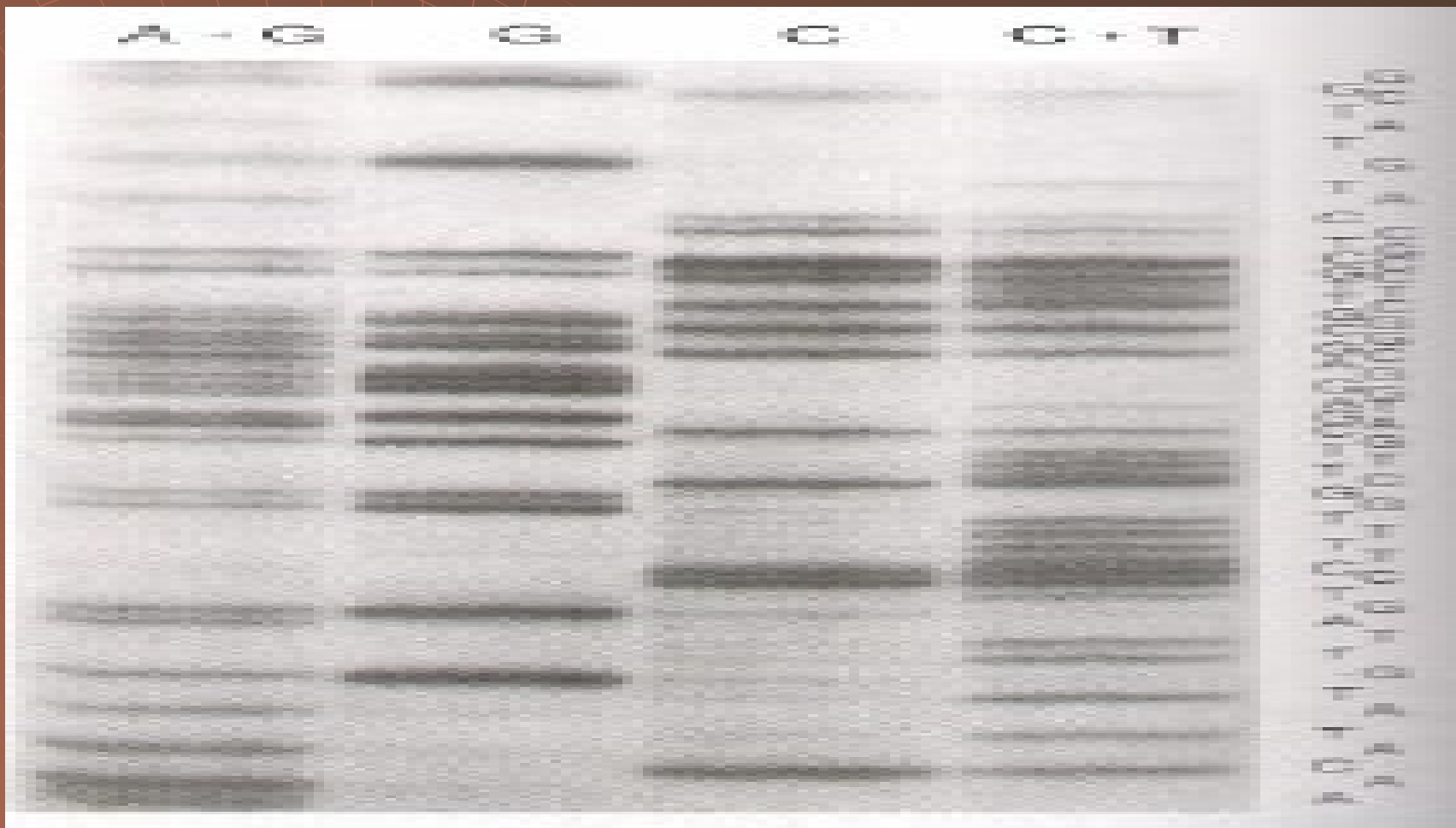
V každé zkumavce je DNA štěpena chemickým činidlem, které selektivně štěpí jeden nebo dva typy bází.

Separace vytvořených fragmentů elektroforézou.



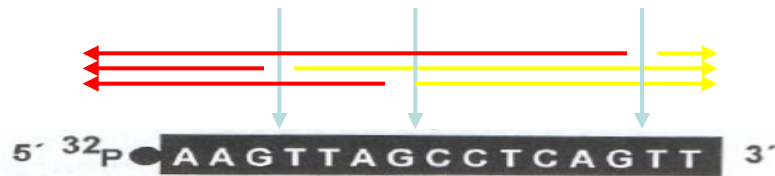
Autoradiografie a odečet sekvence z autoradiogramu.

Maxam Gilbertova metoda

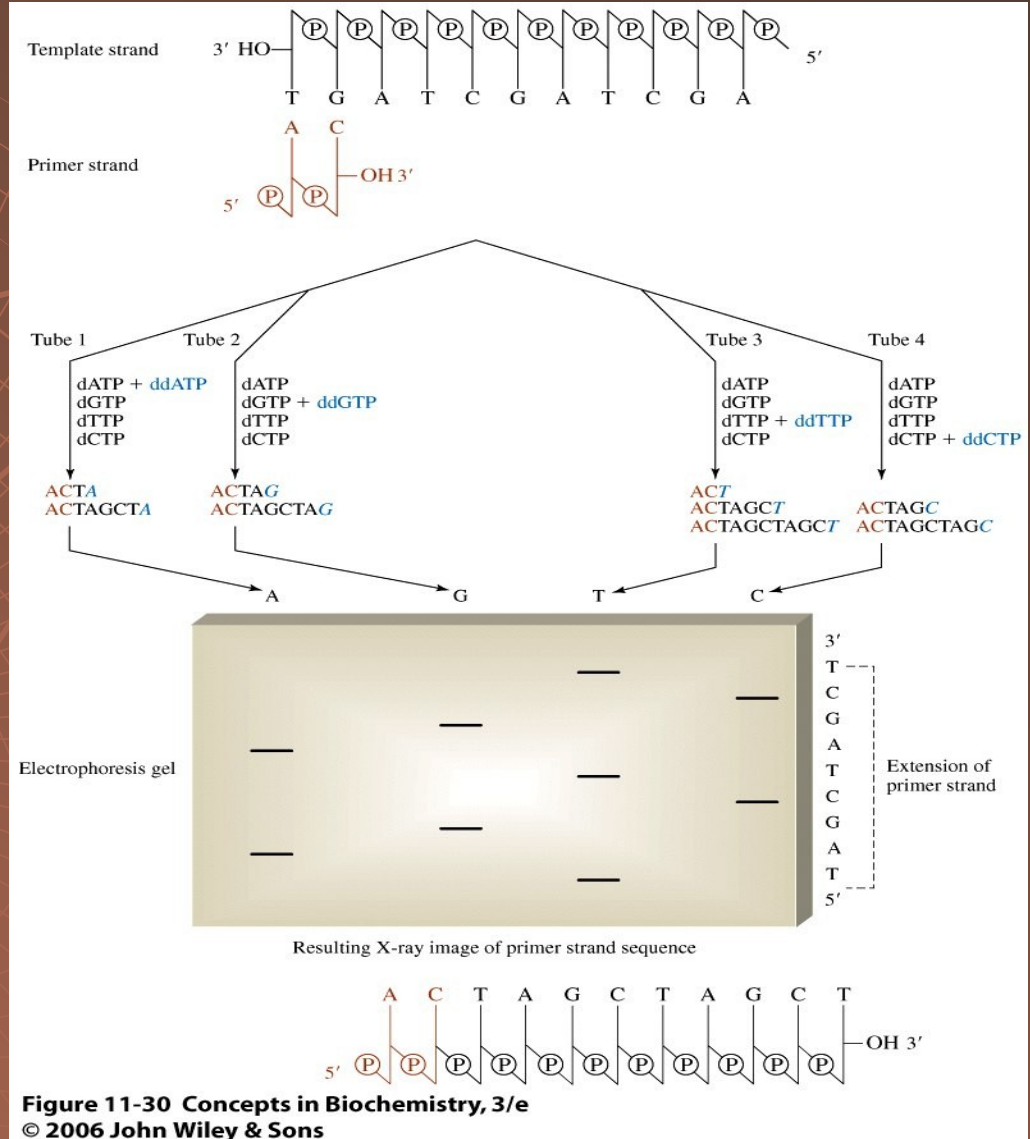
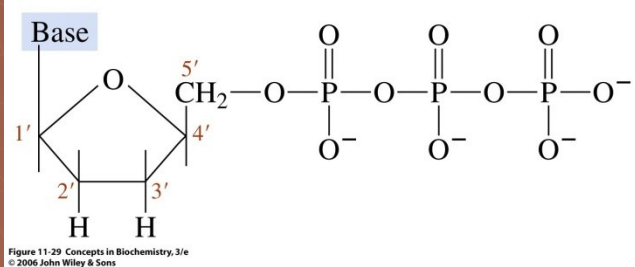


kyselina a piperidin dimetylsulfát a piperidin kyselina, NaCl a piperidin hydrazin a piperidin

Maxam Gilbertova metoda



Enzymová metoda



A G C T

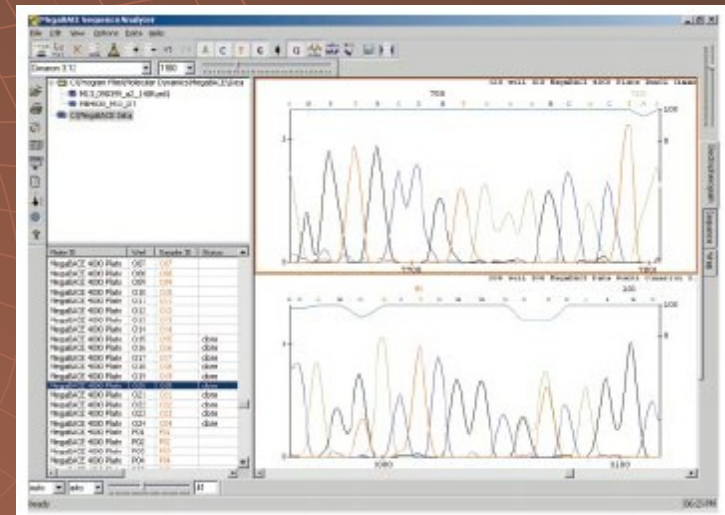
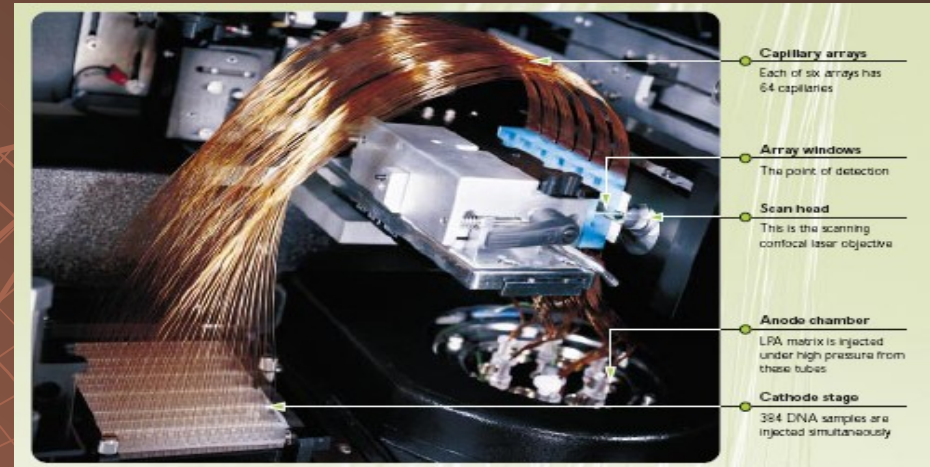
A G C T

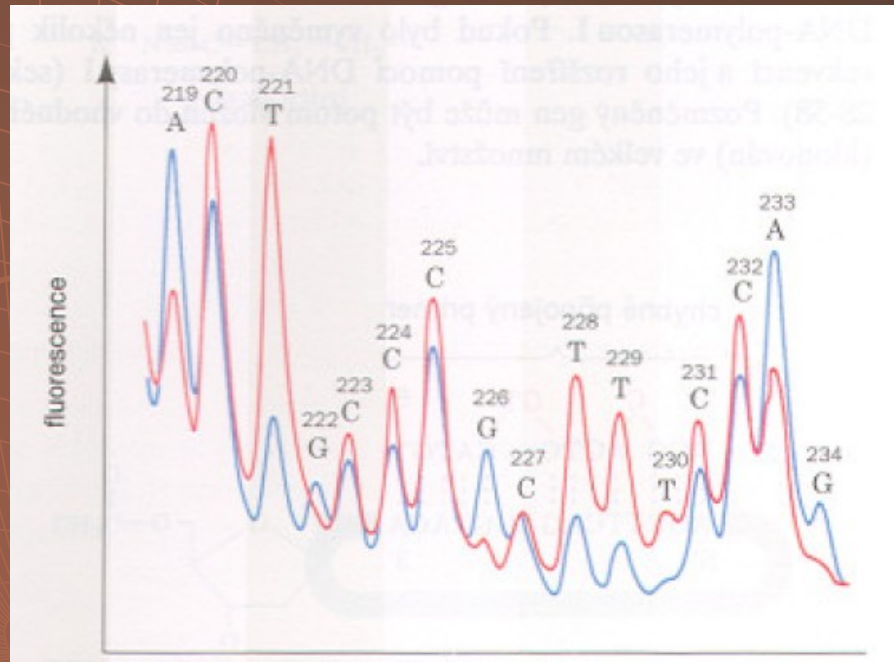


140
AGGTCTCTTGG
CTTTATGTTAT
GTAACAGGAT
GCATTTGAG
90 ATCTGACTATA
TAATAATATG
TCCAAGTTTA

80
ATTGAACT
CAGATAGTAA
TTCCCTGAGTT
CCTGGGAGAA
AACATCCGAA
TGAACCTTTG
TACCCATCAT
TCGTACTTGT

2003 - Projekt lidského genomu





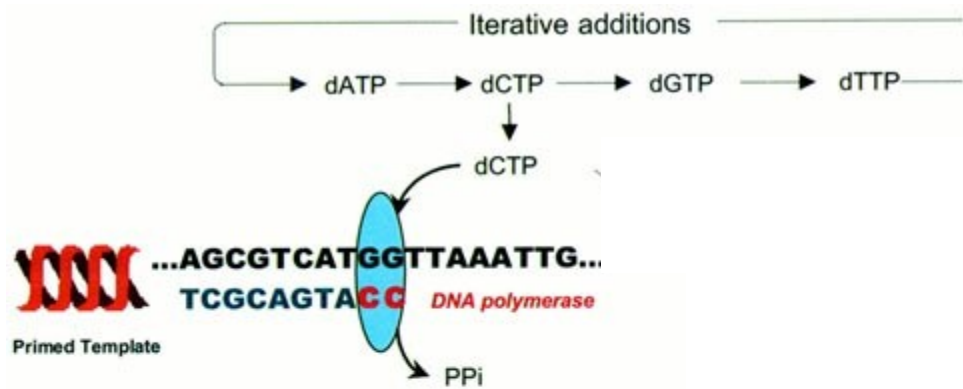


Pyrosekvenování

- První reakcí je DNA polymerace pomocí DNA polymerázy, kdy dochází k zařazení příslušného deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) za uvolnění pyrofosfátu.



Pyrosekvenování



Pyrosekvenování

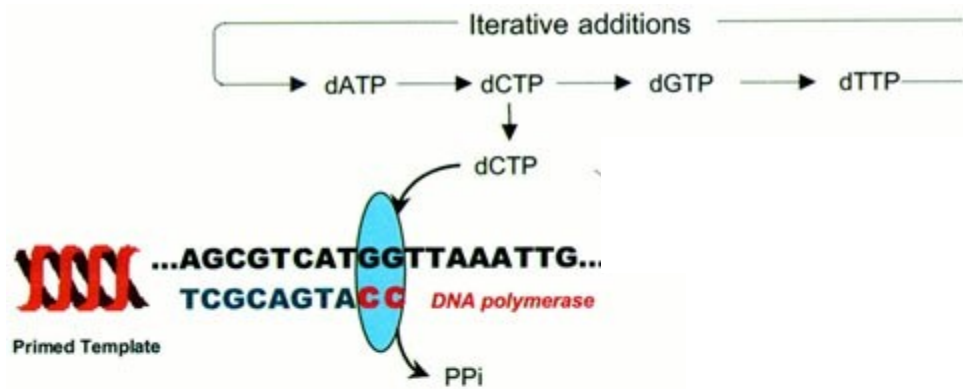
- První reakcí je DNA polymerace pomocí DNA polymerázy, kdy dochází k zařazení příslušného deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) za uvolnění pyrofosfátu.



- Vzniklý pyrofosfát je uvolněn z polymerázy a může sloužit jako substrát pro ATP sulfurylázu. Při této reakci dojde ke kvantitativnímu převedení pyrofosfátu na ATP.



Pyrosekvenování



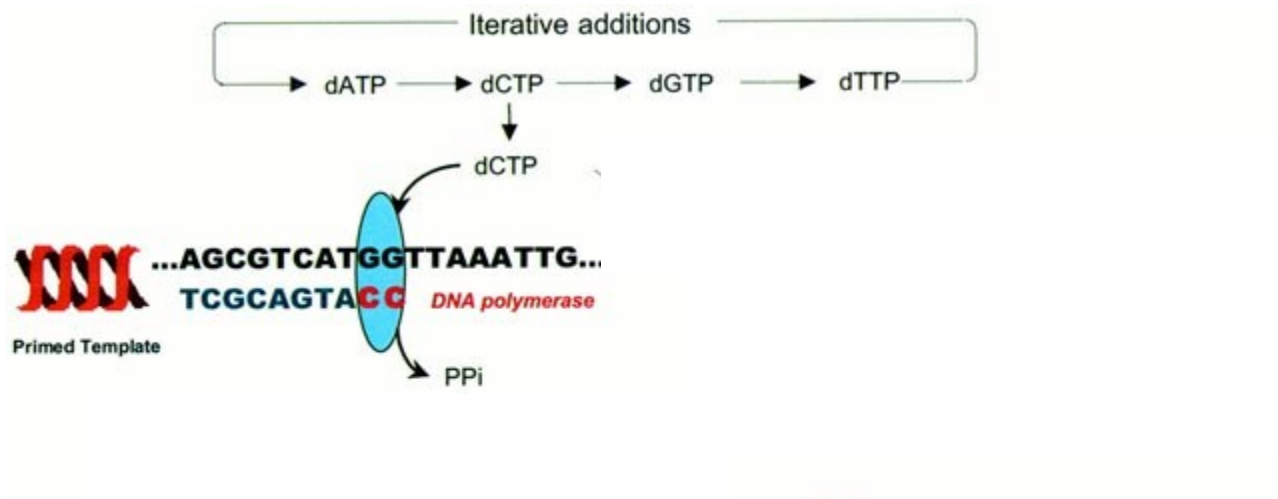
Pyrosekvenování

- Během třetí a čtvrté reakce je ATP převedeno na světelný signál pomocí enzymu luciferázy a následně je světelný signál detekován a vyhodnocen programem.

Luciferáza + D-luciferin + ATP → Luciferáza-luciferin-AMP + PPi

Luciferáza-luciferin-AMP + PPi + O₂ → Luciferáza + Oxyluciferin + AMP + CO₂ + světlo

Pyrosekvenování

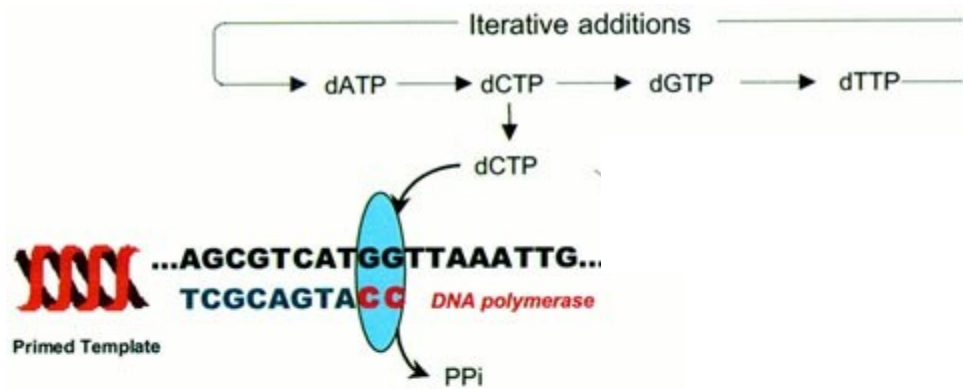


Pyrosekvenování

- Poslední enzymatickou reakcí je reakce apyrázy, která odstraní nezainkorporované nukleotidy a ATP, aby následně mohlo dojít k zopakování celého výše popsaného procesu a mohlo být analyzováno zařazení dalšího nukleotidu. Tato degradace je nezbytná, aby bylo zajištěna synchronizace mezi syntézou a detekcí světelného signálu.

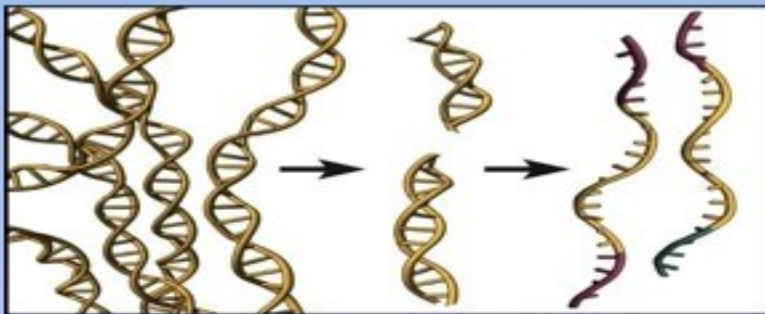


Pyrosekvenování

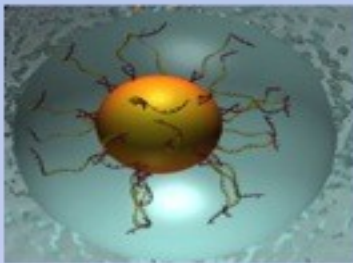


Pyrosekvenování

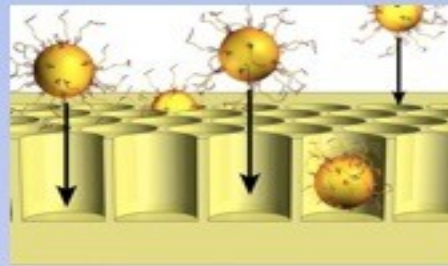
Process Overview



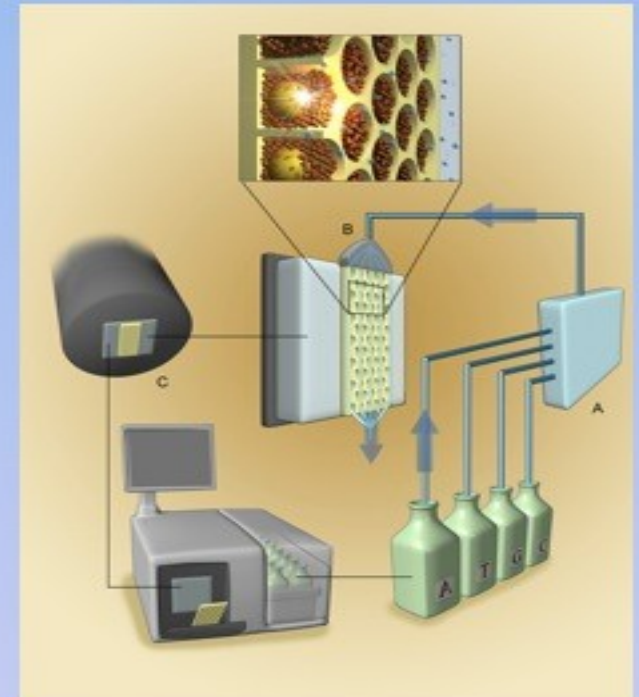
1) Prepare Adapter Ligated ssDNA Library



2) Clonal Amplification on 28 μ beads



3) Load beads and enzymes in PicoTiterPlate™



4) Perform Sequencing by synthesis on the 454 Instrument

454 pyrosekvenování

Technologie využívá paralelní sekvenace: více než

-2 milion sekvencí zároveň.

-Lze získat až 1GB (gigabázi) informace během jedné analýzy (cca4.5 h).

Využití:

-sekvenace genomů (náhodně naštěpená genomová DNA je sekvenována a sestavena)

- studium metagenomů (tj. souhrn všech genů, přítomných v daném prostředí, používá se DNA extrahovaná ze vzorku půdy, vody, sedimentu, mikroflóry střeva ad.)

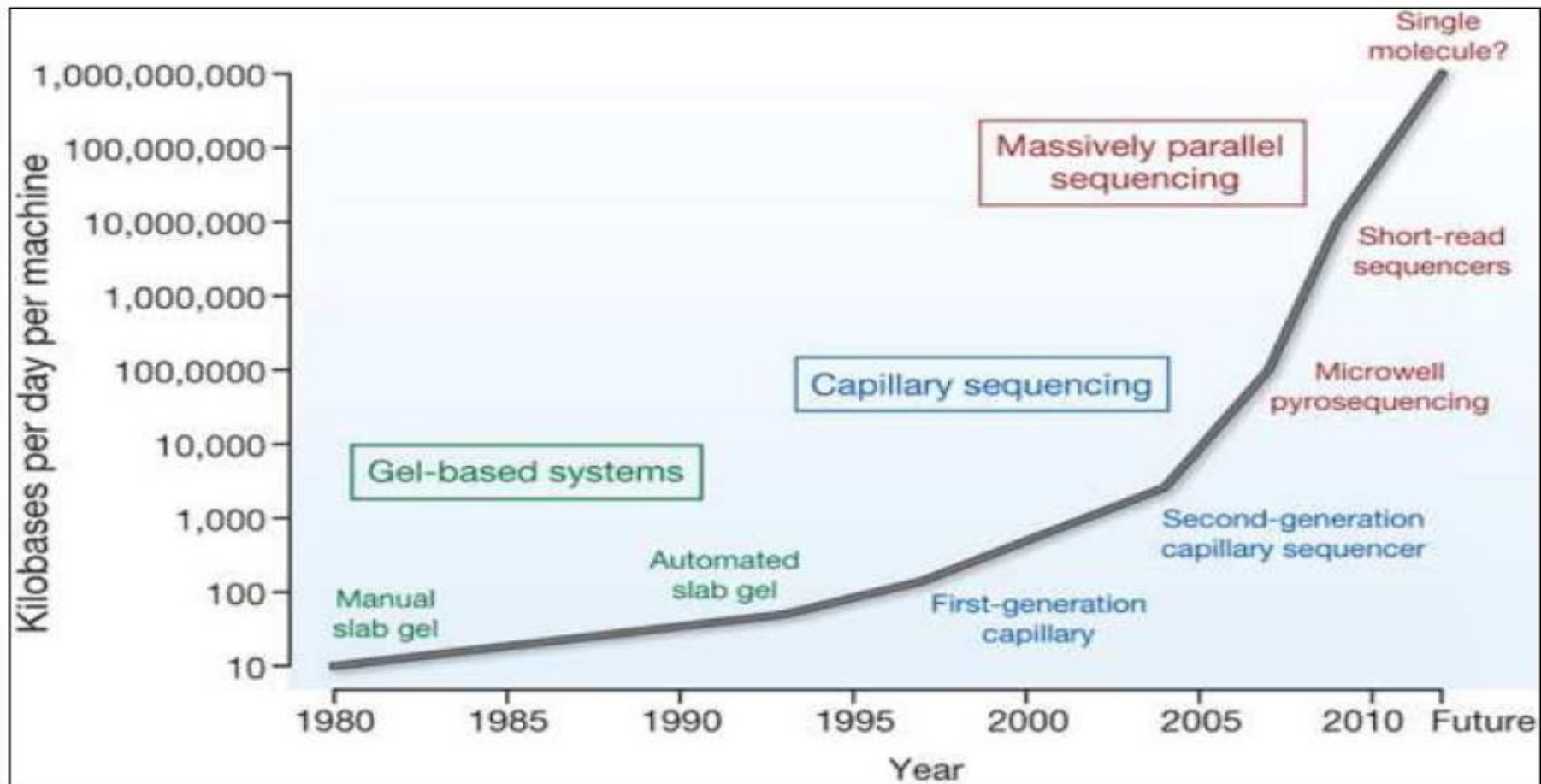
- tzv. ampliconové sekvenování. Vlastní sekvenaci předchází PCR zacílená na 16S nebo 18S geny prokaryot a eukaryot

- analýza typu „shotgun“ – veškerá DNA / RNA, získaná ze vzorku

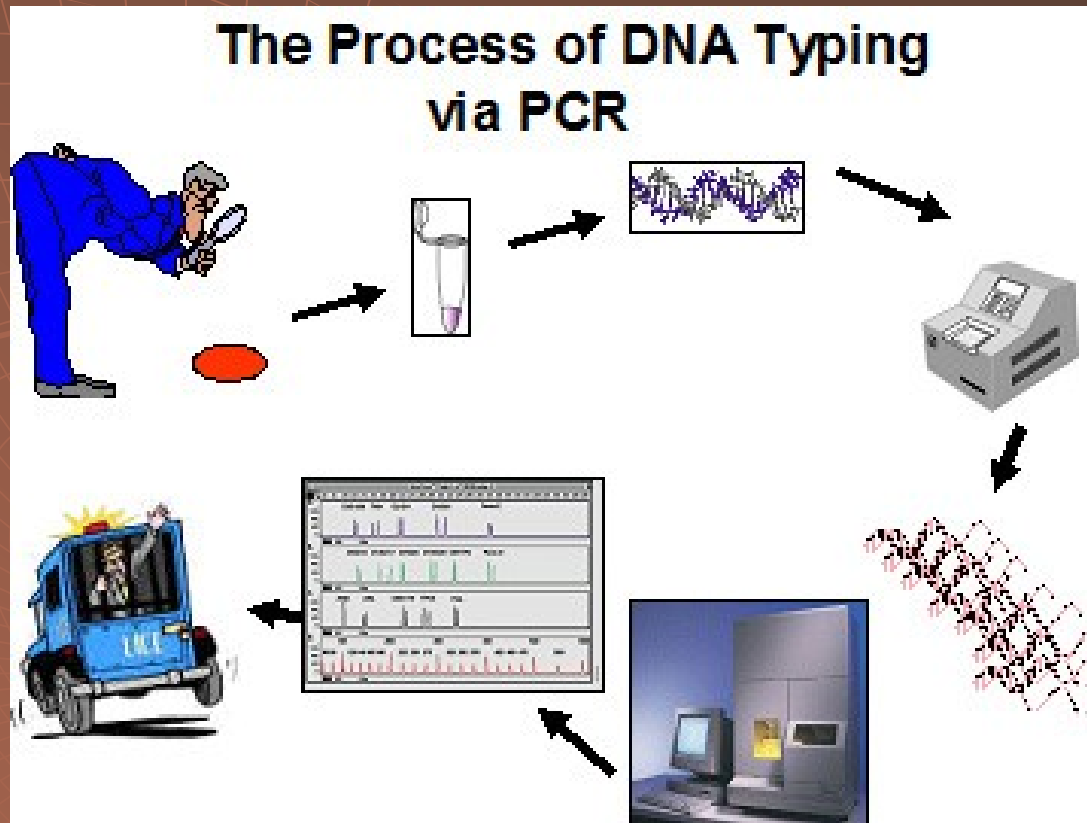


Zařízení je velmi nákladné (cca 17 mil. Kč), analýzy jsou ale dostupné komerčně, takže většina laboratoří v současnosti využívá služeb externích sekvenačních středisek.

Sekvenování

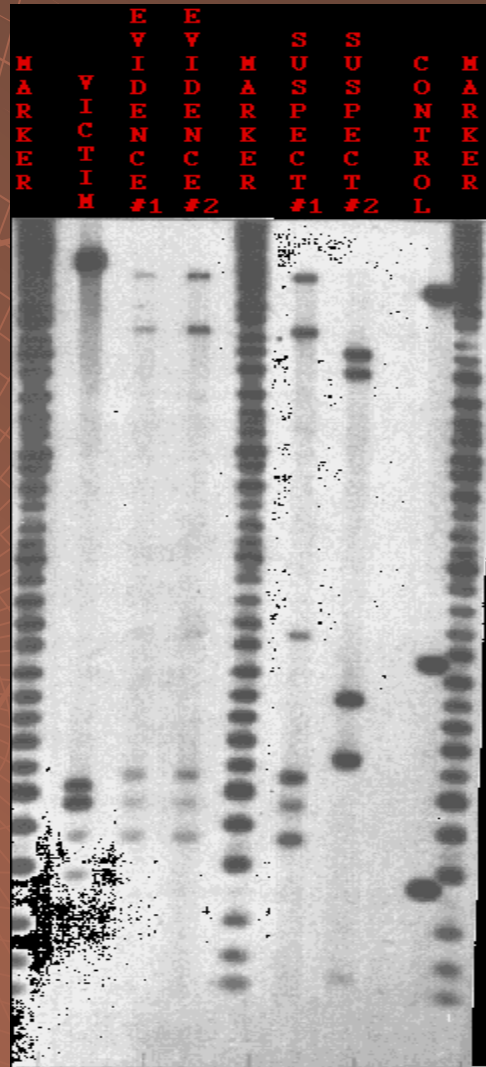


Genetická daktyloskopie

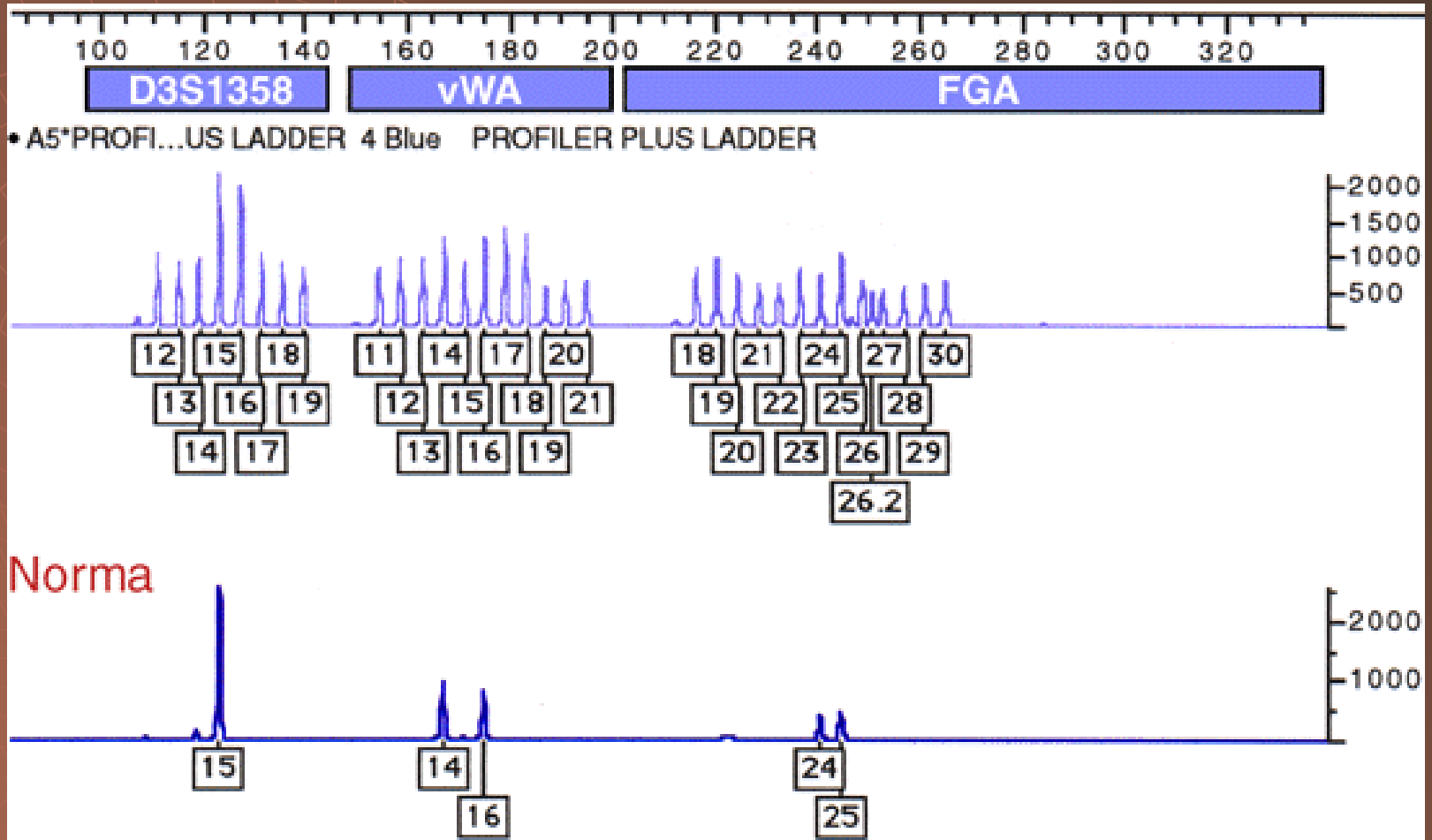


Použití restrikčních enzymů - RFLP

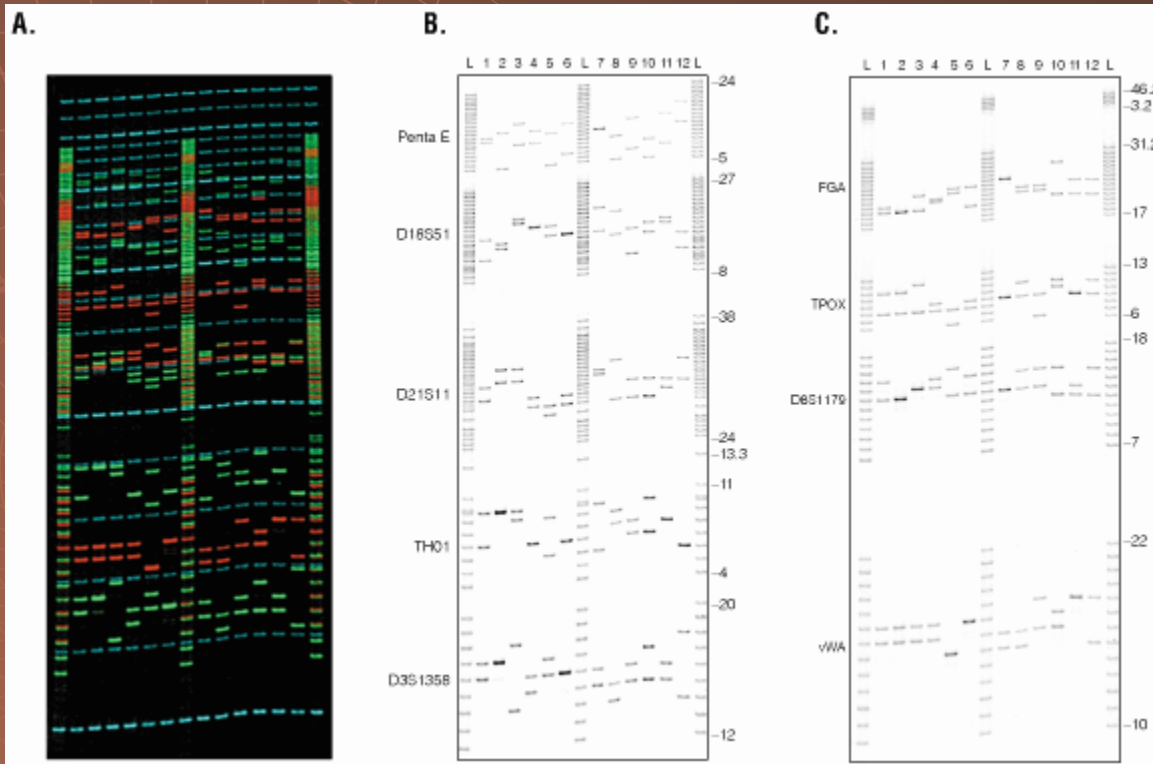
Restriction Fragment Length Polymorphism



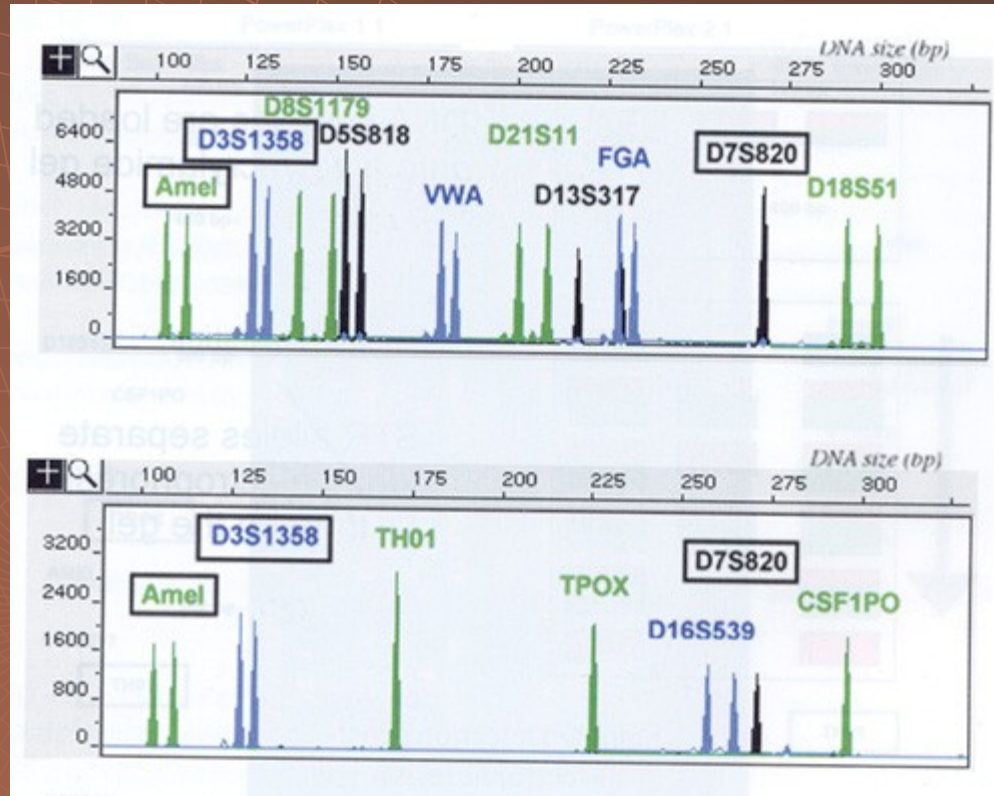
Short tandem repeats



Short tandem repeats



Short tandem repeats

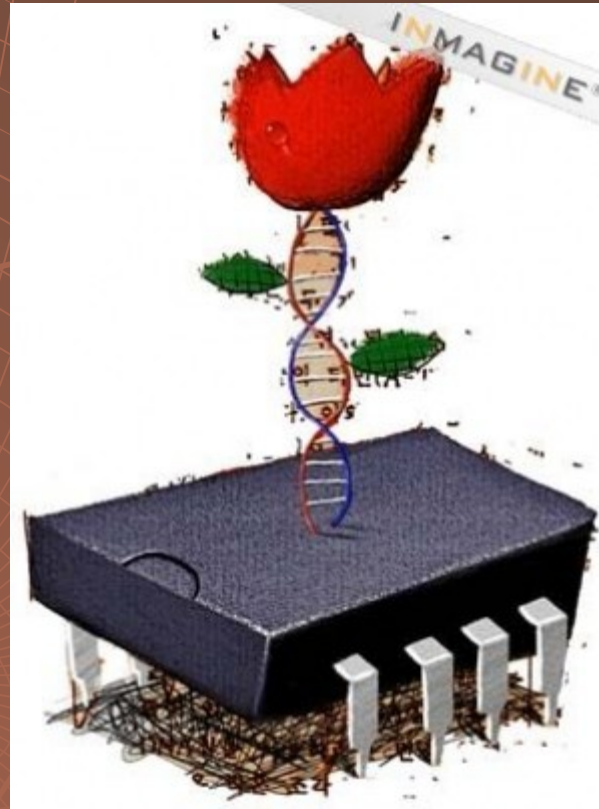


Testy paternity

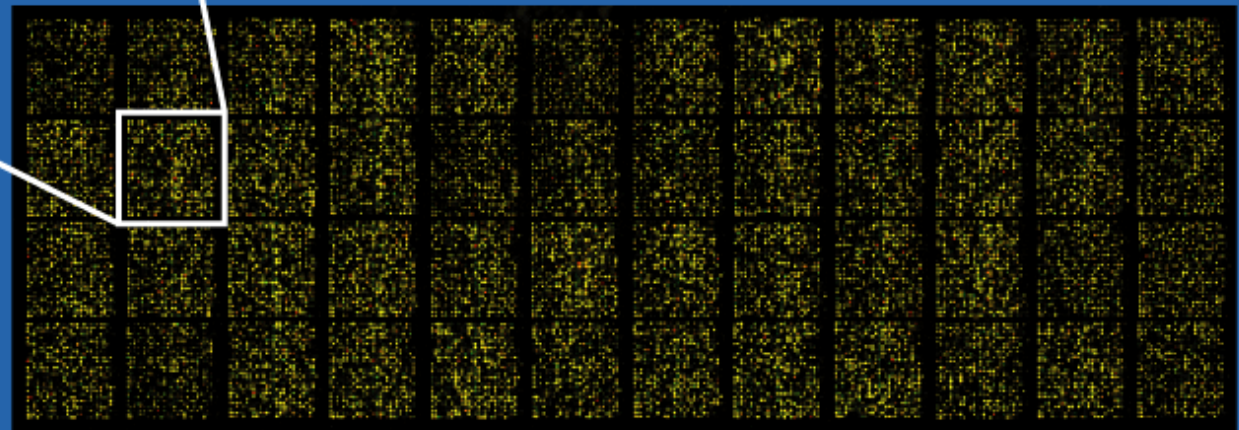
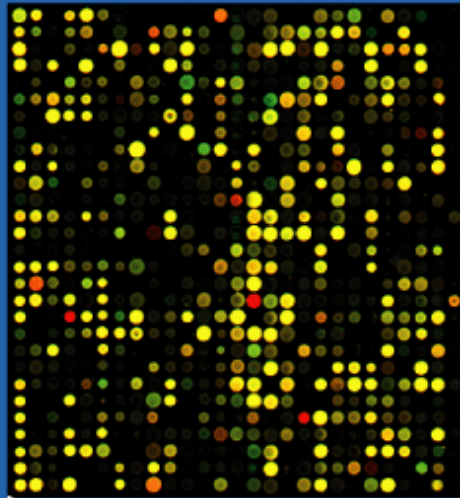
Zjednodušené testy

- ◆ STR na Y chromosomu – mužských potomků srovnání s otcem
- ◆ Mitochondriální DNA – dědí se po matce – matroklinní dedičnost

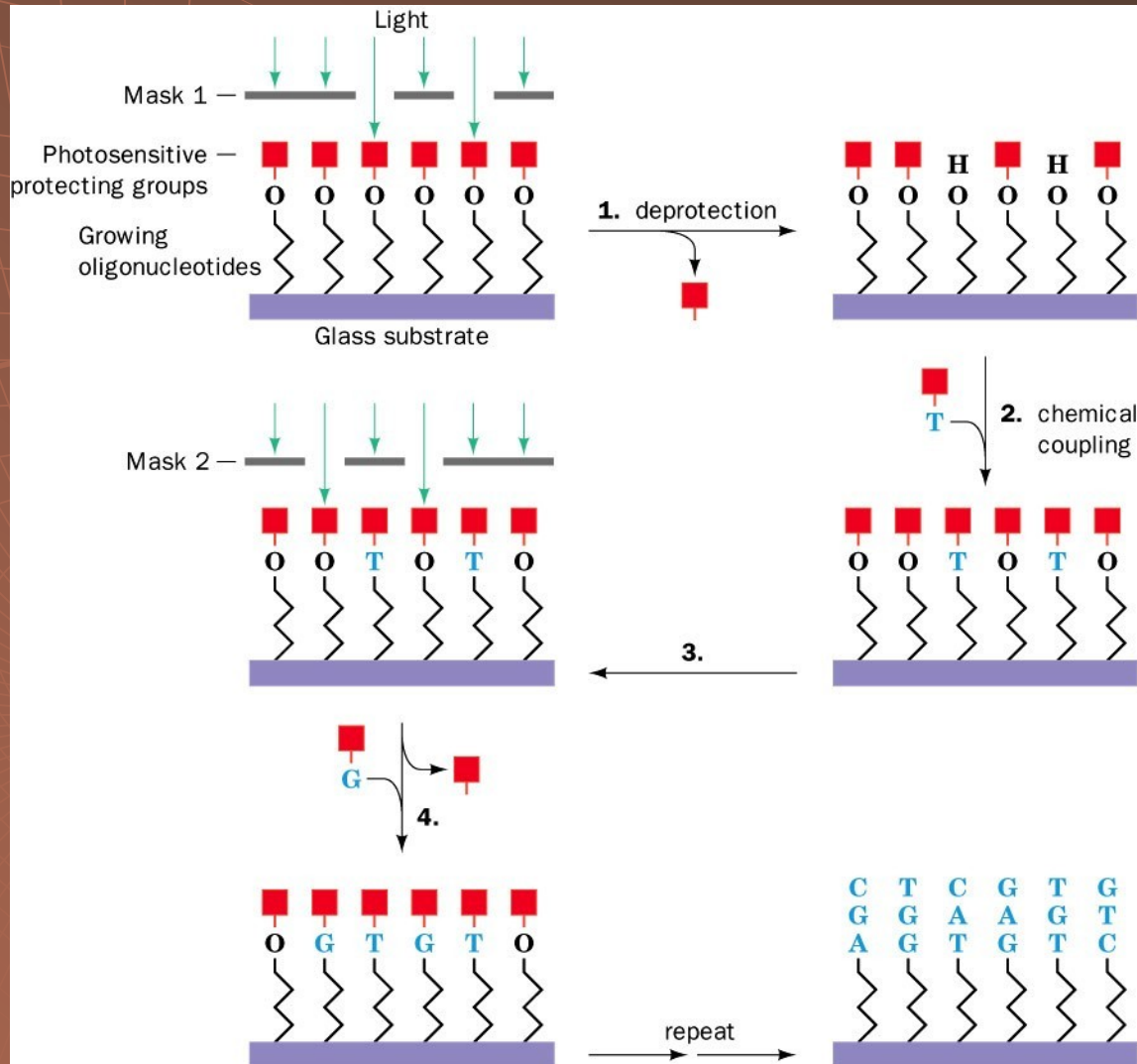
DNA chipy



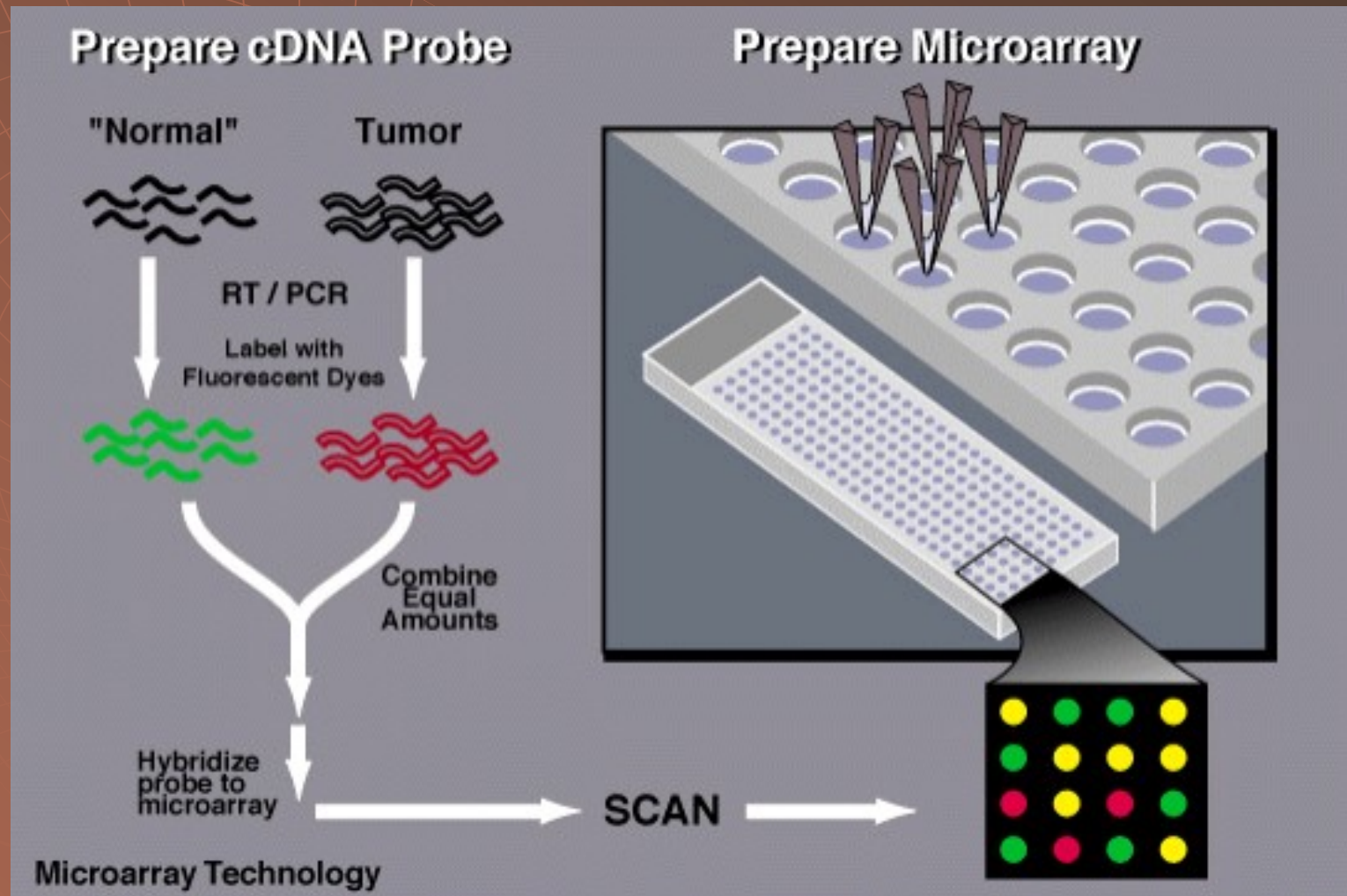
DNA chipy



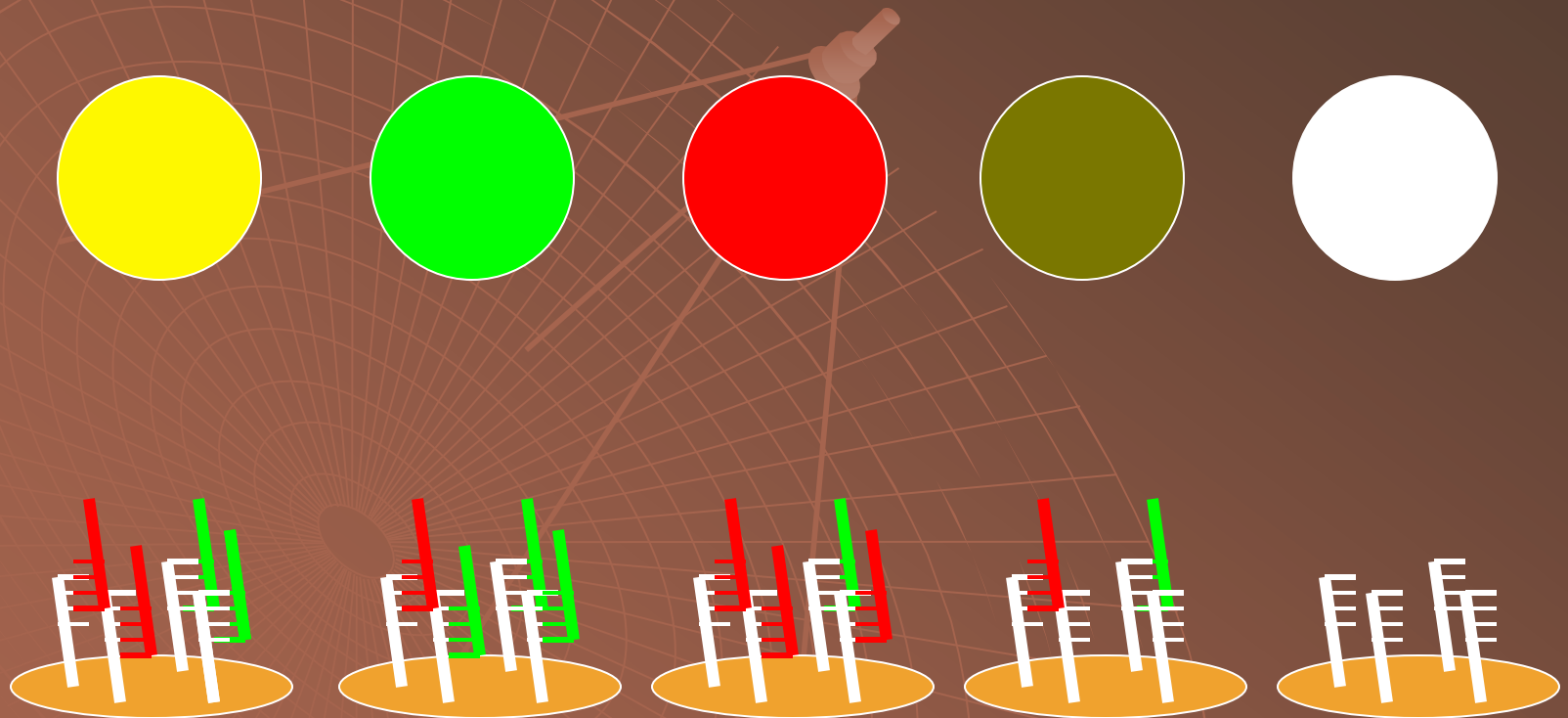
DNA chipy



DNA chipy



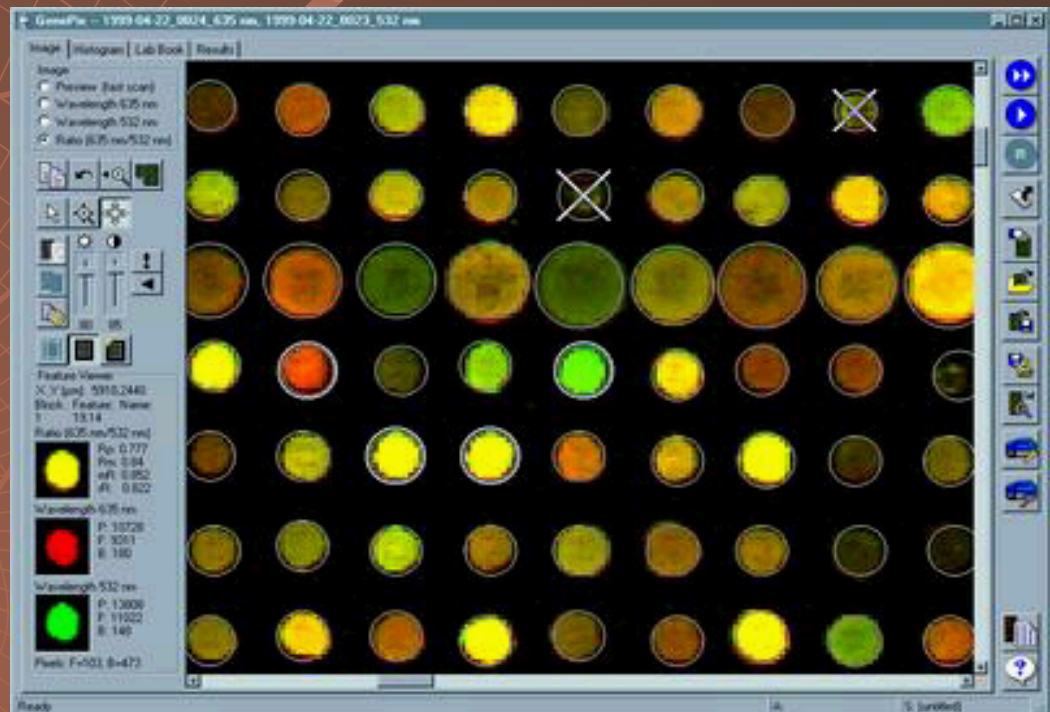
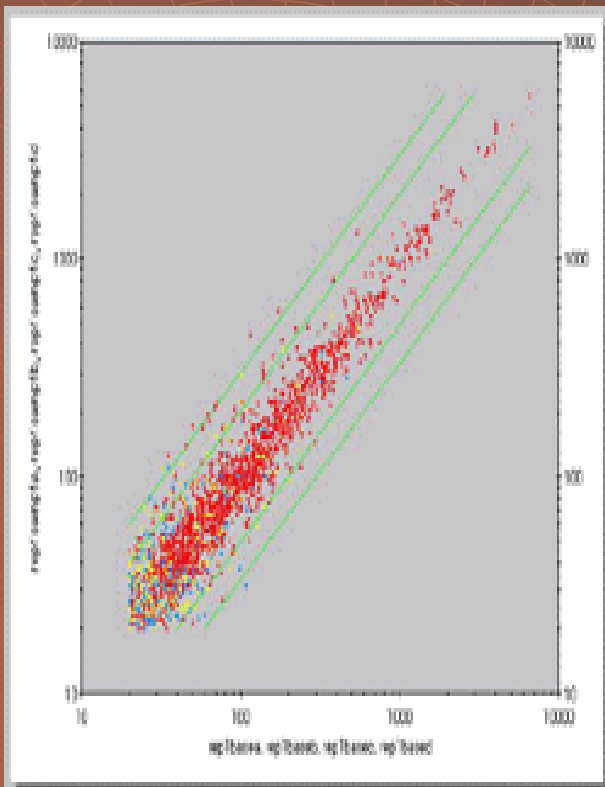
DNA chipy - barva skvrn

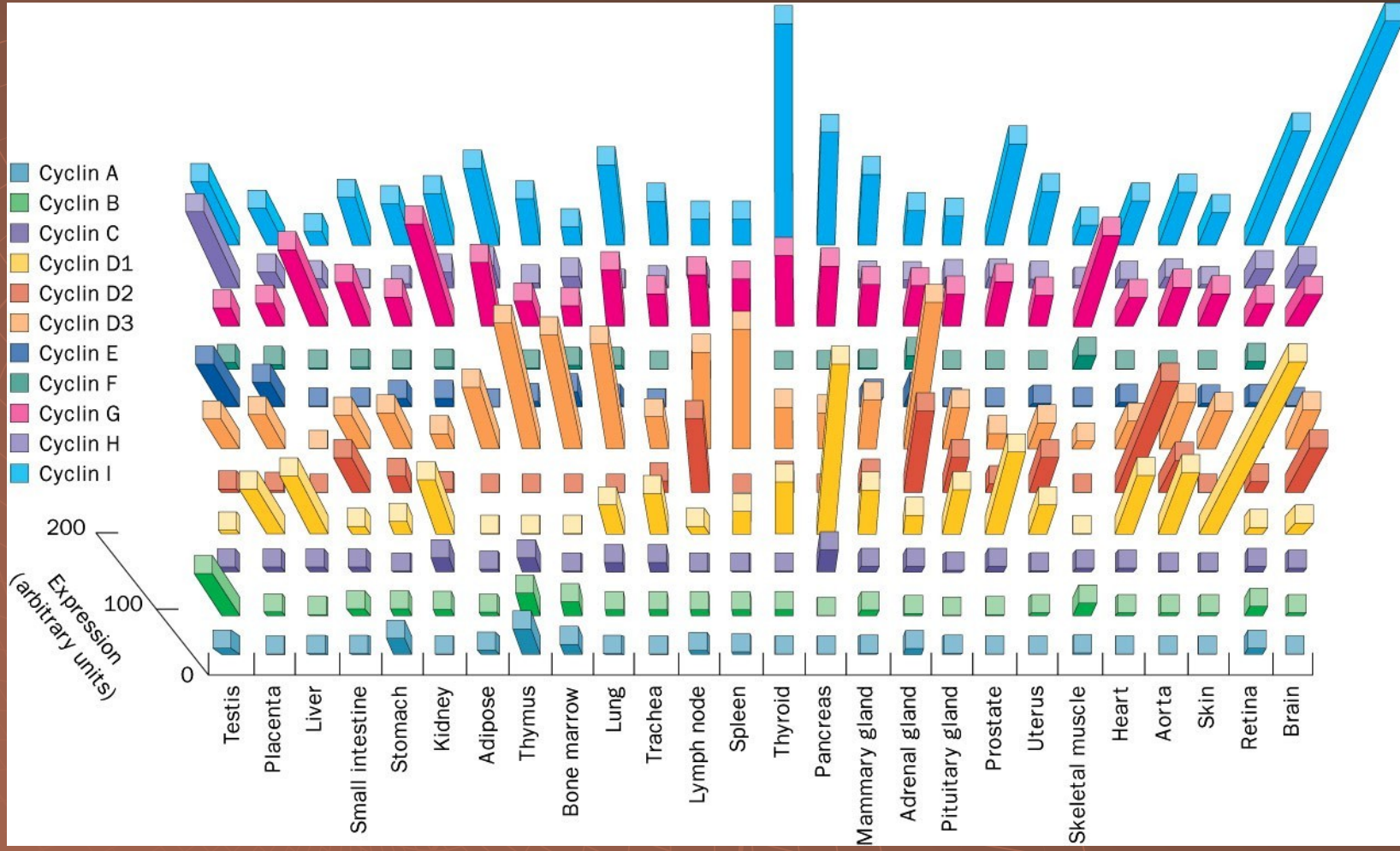


DNA chipy - vybavení

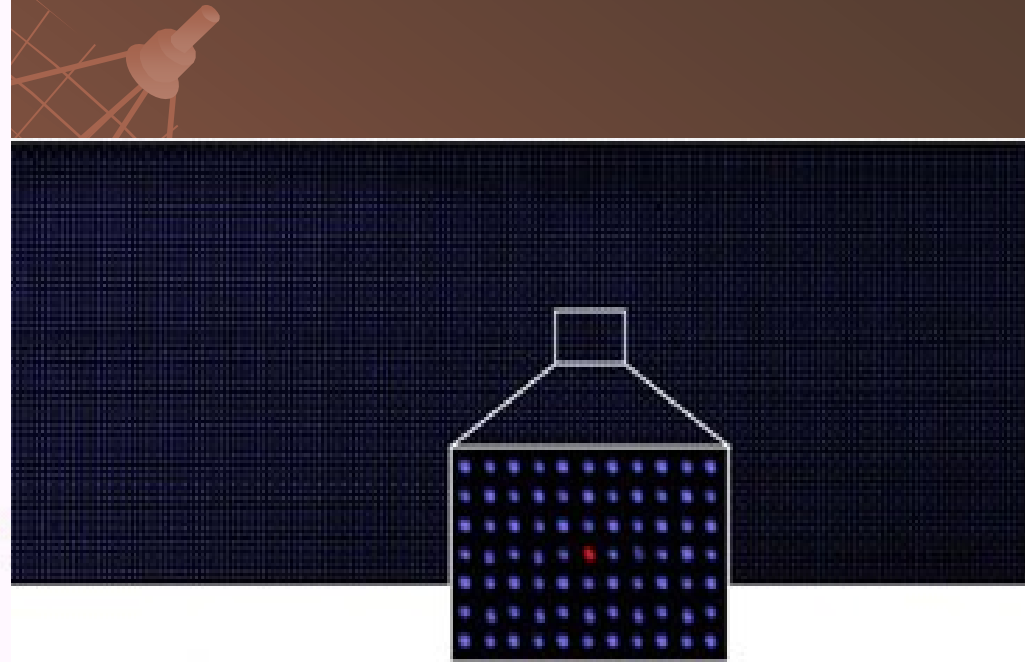


DNA chip software





Proteinové chipy

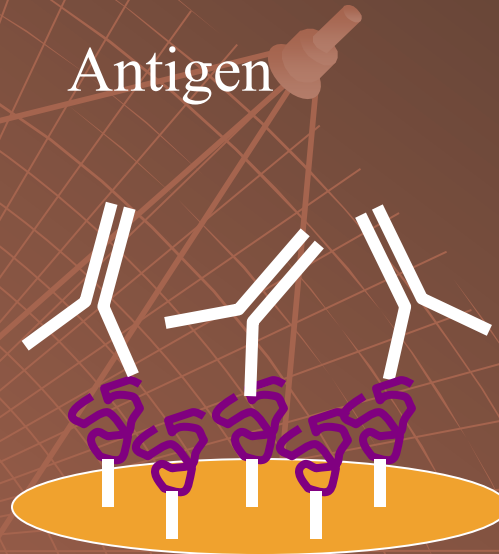


Proteinové chipy – typy interakcí

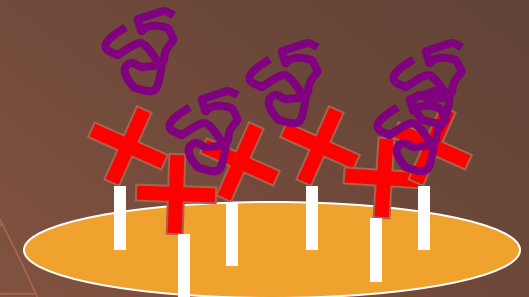
- Protilátka



- Antigen

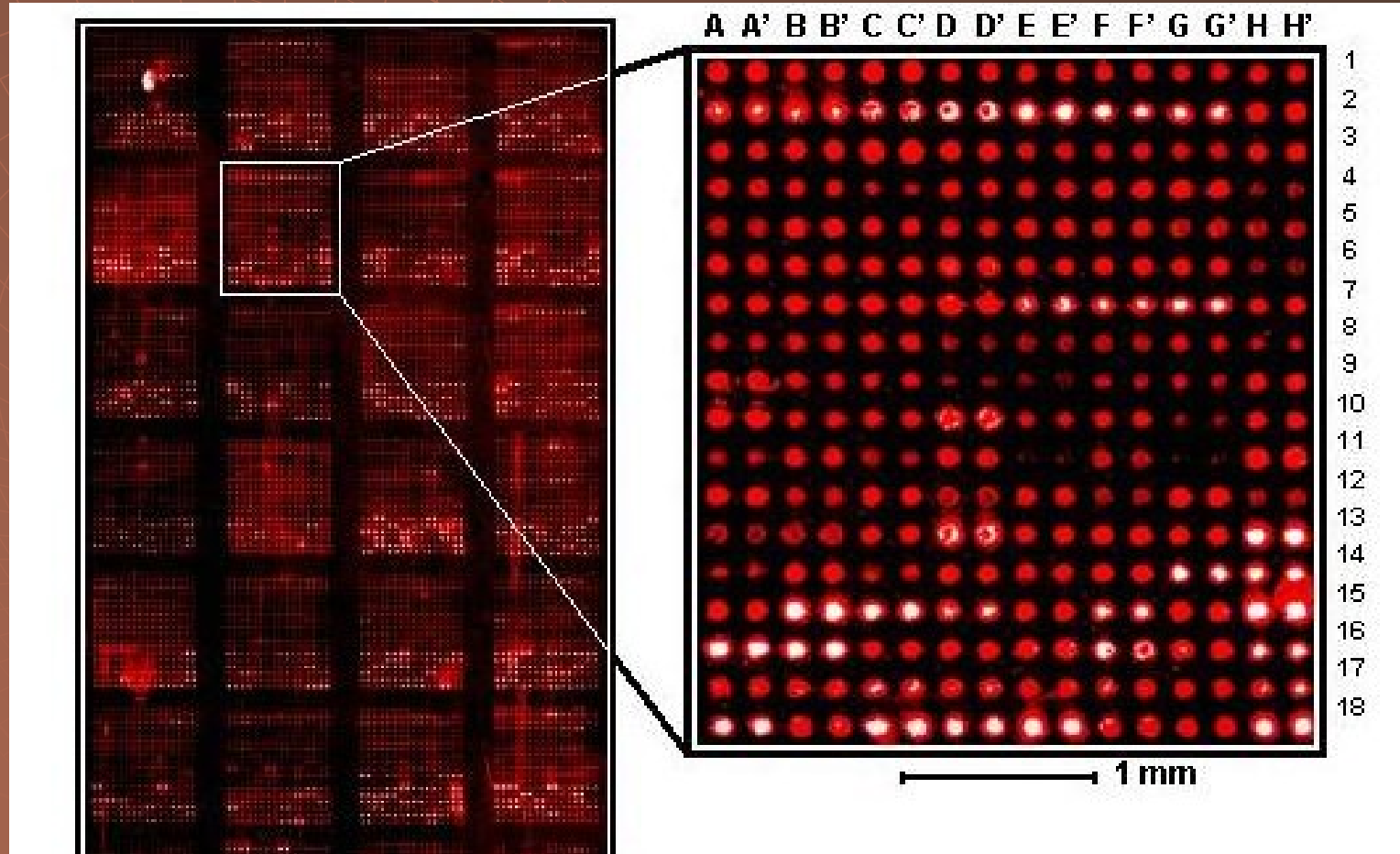


- Ligand



- Detekce: SELDI MS, fluorescence, SPR, electrochemická, radioaktivita,

Anti-GST Probe



Blotting

- ◆ Southern – DNA
- ◆ Northern – RNA
- ◆ Western - bílkoviny

Izolace nukleových kyselin

Důraz kladen na čistotu
nikoliv množství - PCR

Cíl izolace

- ◆ Odstranění proteinů
- ◆ DNA vs RNA
- ◆ izolace specifického typu NK

Typy NK

- ◆ genomická (chromosomální)
- ◆ organelová (mitochondrie, chloroplasty)
- ◆ plasmidy (extra-chromosomální)
- ◆ virová (ds nebo ss)
- ◆ komplementární (mRNA)

Nejpoužívanější metody

- ◆ na základě rozdílné rozpustnosti – extrakce, srážení
- ◆ na základě vlastností - chromatografie – polarita- adsorpční, náboj-ionexová
- ◆ sedimentace - gradientová ultracentrifugace

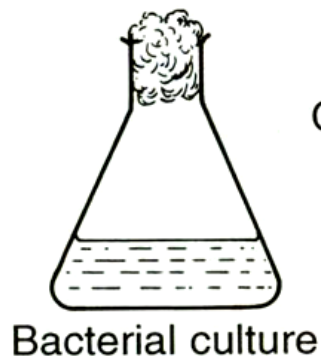
Postup

1. Rozbití buněk a membrán pro uvolnění NK
2. Inaktivace DNA- nebo RNA-degradujících enzymů (DNasy, RNasy).
3. Separace NK od dalších komponent uvolněných z buňky.
 - Extrakce/Precipitace
 - Chromatografie
 - Ultracentrifugace

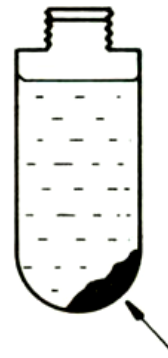


Extrakce/Precipitace

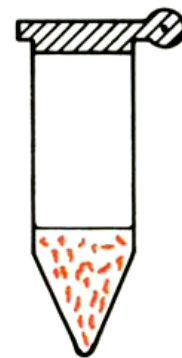
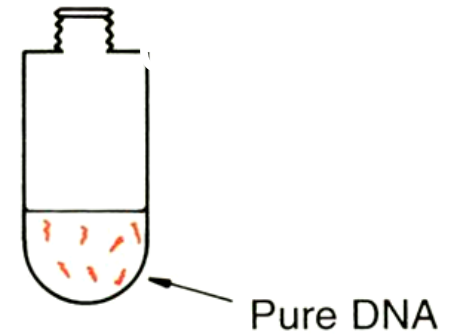
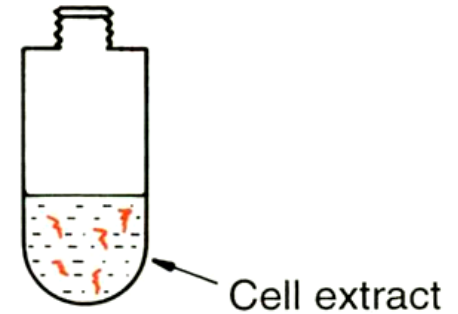
1 A culture of bacteria is grown and then harvested



Centrifugation



2 The cells are removed and broken to give a cell extract



4 The DNA is concentrated

3 The DNA is purified from the cell extract

Izolace genomické DNA

Typická procedura

1. *Sklizení buněk*

2. *Lyse buněk*

0.5% SDS + proteinase K (55°
několik hodin)

3. *Fenolová extrakce*

Jemné třepání několik hodin

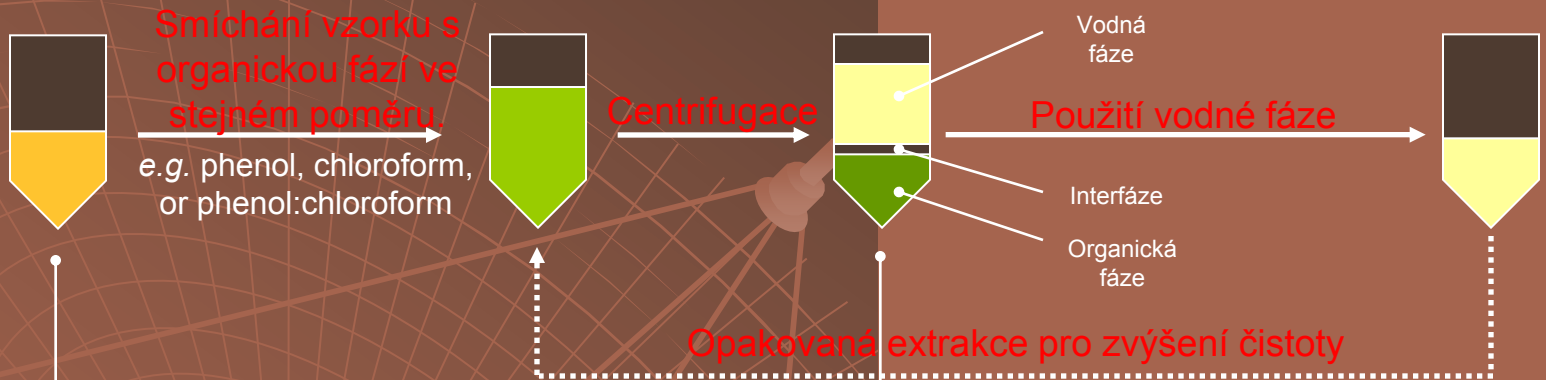
4. *Ethanolová precipitace*

5. *Působení RNAsy a proteinasy K*

6. *Opakování kroku 3 a 4.*

Extrakce/Precipitace

Krok 3: Organická extrakce

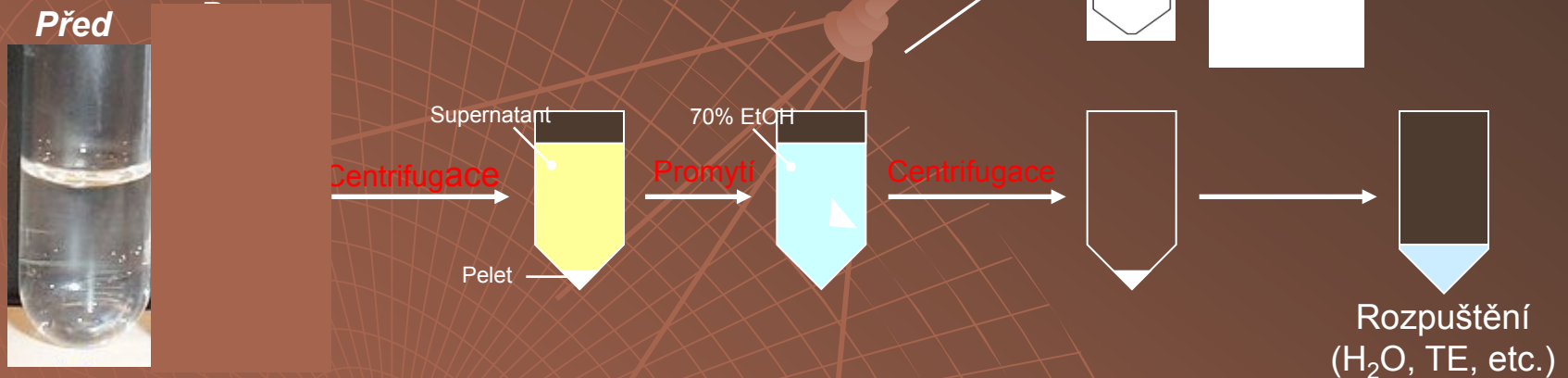


Hrubý lyzát obsahující NK a další součásti buňky

Vodná fáze obsahuje NK, organická fáze bílkoviny a lipidy. Nerozpustné složky přítomné v **interfázi**.

Extrakce/Precipitace

Krok 4: Precipitace NK



Přidání EtOH a soli

2-2,5 objem EtOH

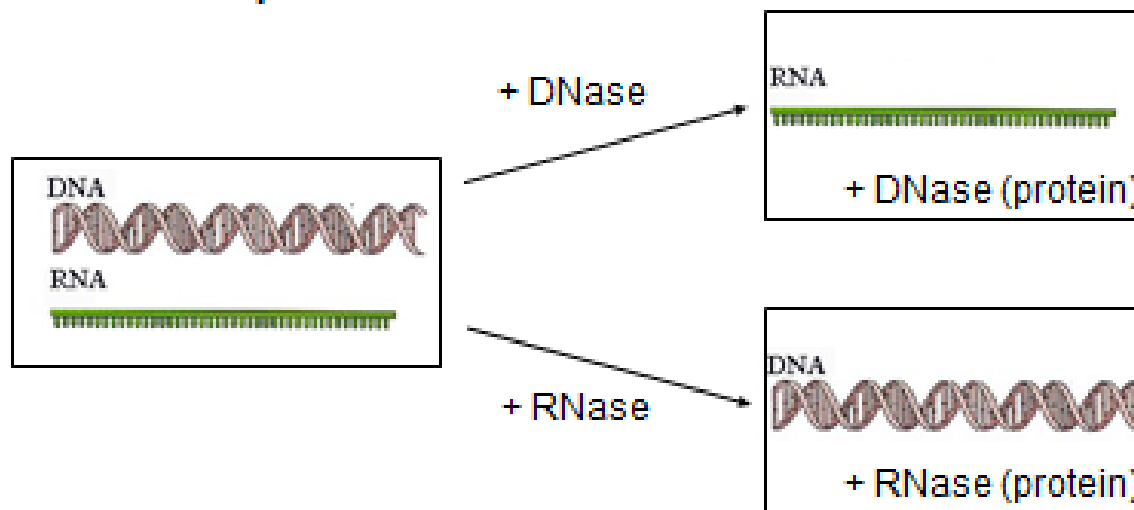
-20° C

Vysoká I

pH 5-5.5

Detail kroku 5

Použití nukleas pro odstranění nechtěné DNA nebo RNA



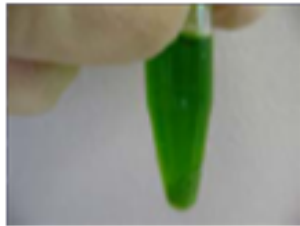
The background features a faint, light-colored grid pattern typical of a chromatogram. The grid consists of concentric circles and radial lines. A prominent red spot is visible on the grid, and a blue line is drawn across it, possibly representing a separation path or a specific component's migration.

Chromatografie

Adsorpční chromatografie

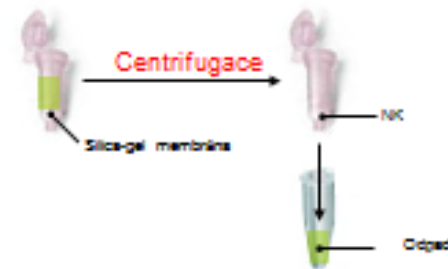
Adsorpční chromatografie

Krok 1: Příprava lyzátu



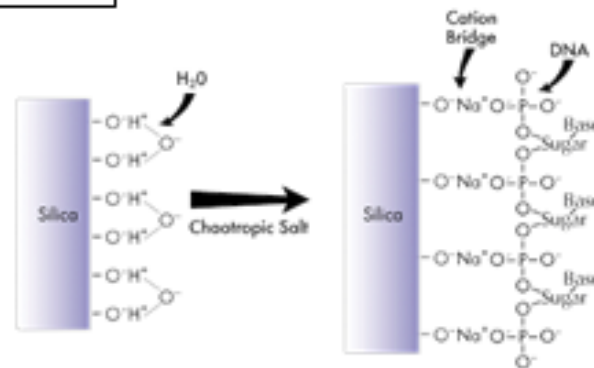
Aplikace na
kolonku

Krok 2: Adsorpce na silikagel



Extrakční pufr pro vazbu DNA a
RNA na silikagel:

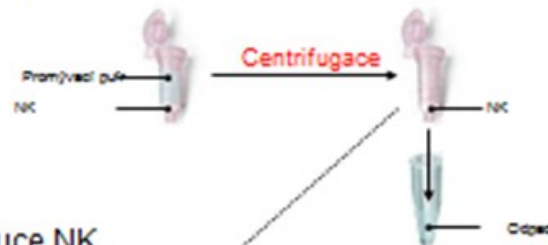
- nízké pH
- vysoká iontová síla
- chaotropní soli



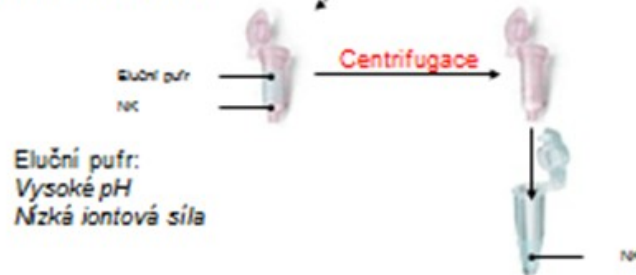
Adsorpční chromatografie

Adsorpční chromatografie

Krok 3: Vymytí kontaminant

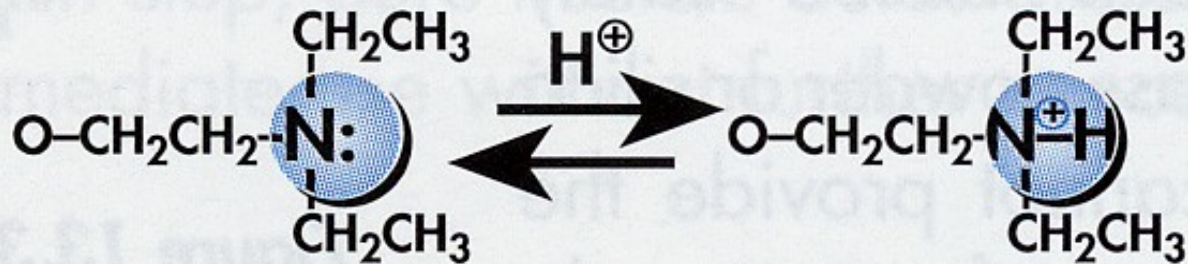


Krok 4: Eluce NK



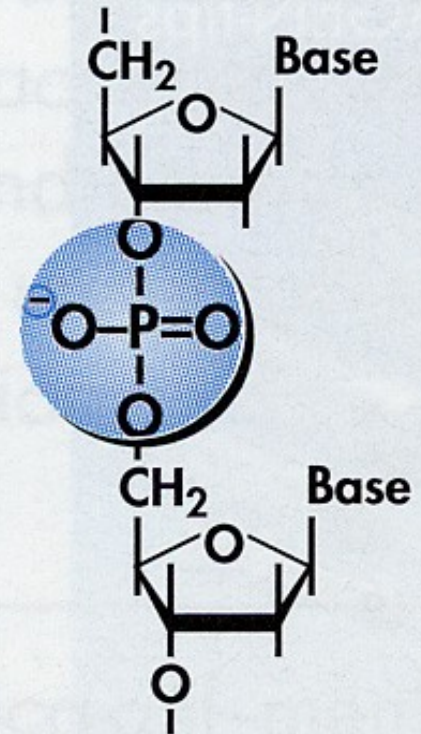
Ionexová chromatografie

Vazba při nízkém pH nízké I



Eluce zvýšením pH nebo vysokou I

DEAE (diethylaminoethanol)

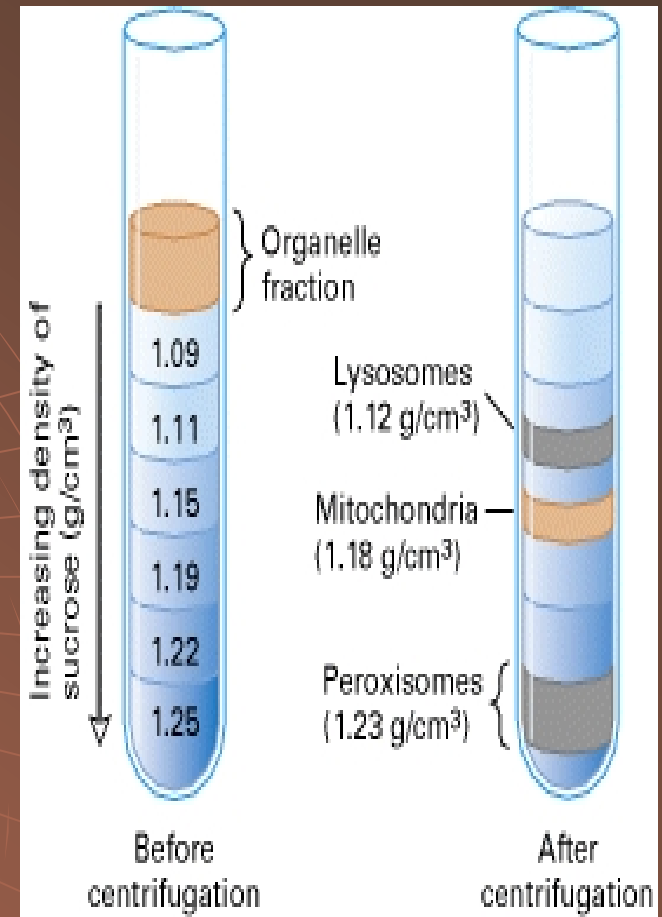
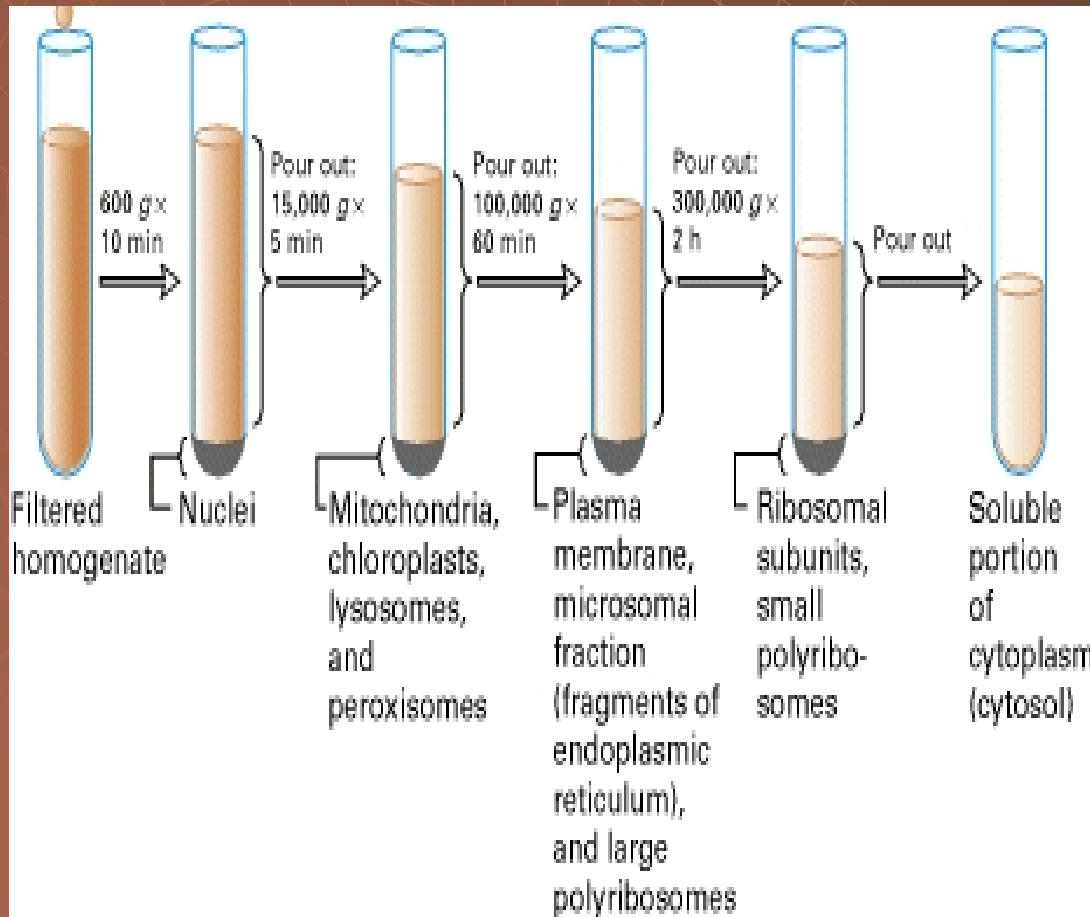


Chemical structure
of DNA

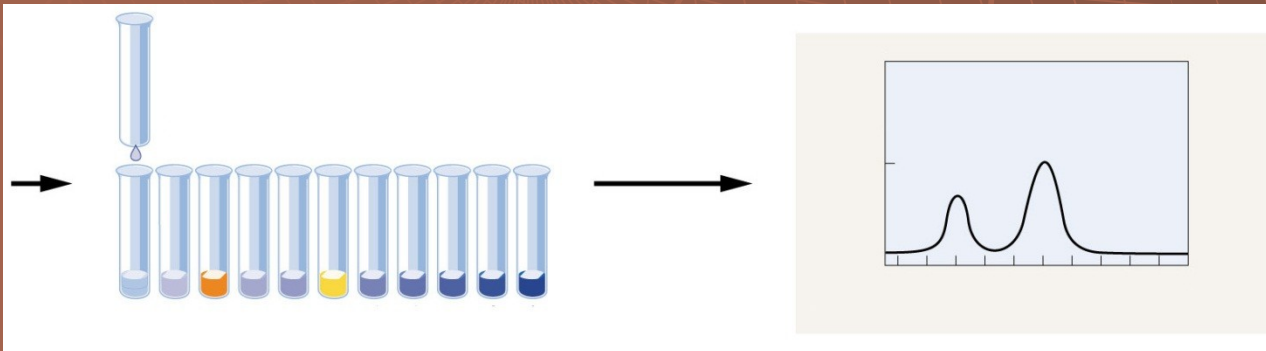
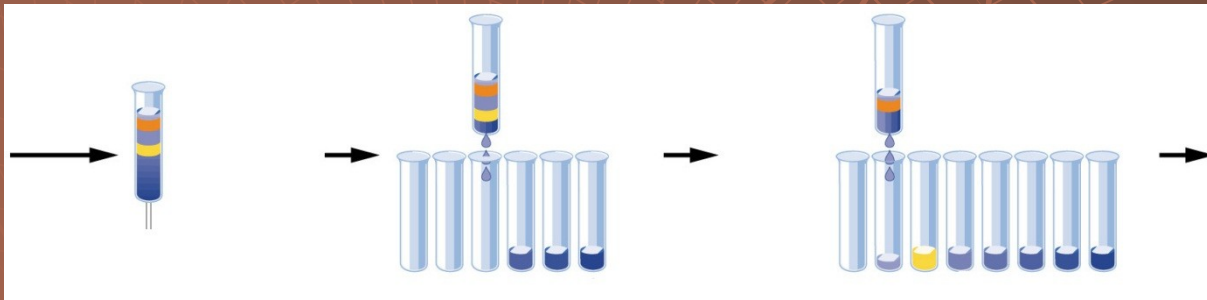
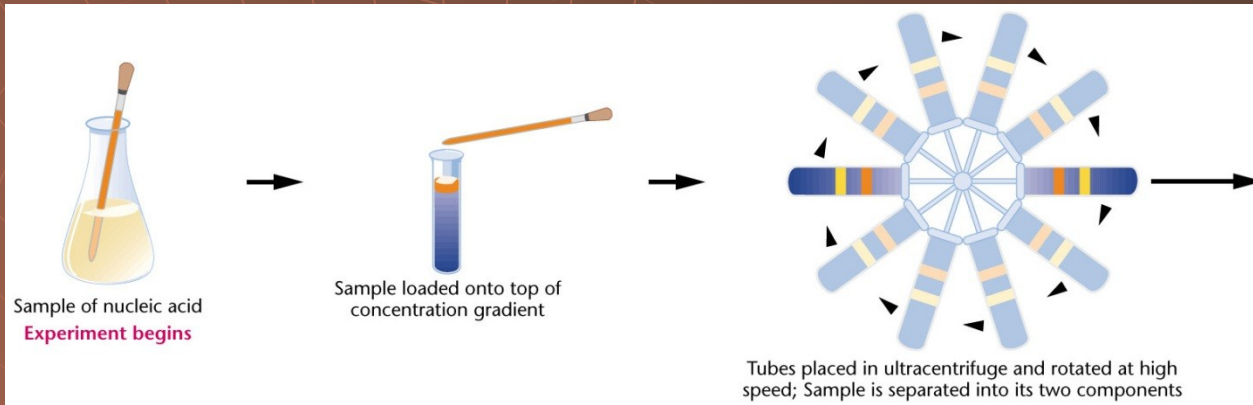


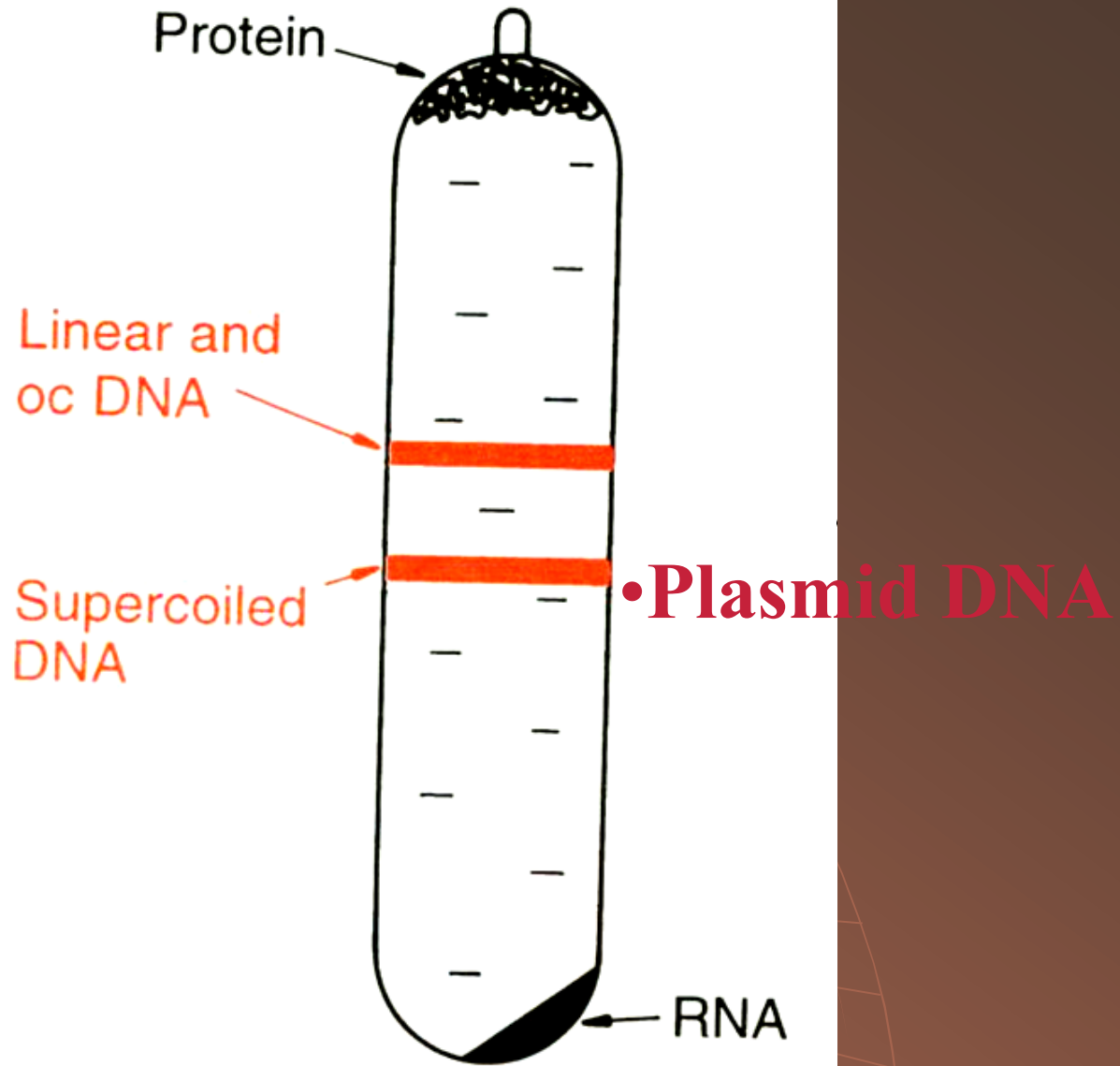
Gradientová centrifugace

Diferenciální versus gradientová centrifugace



Gradientová centrifugace DNA CsCl





(a) An EtBr-CsCl density gradient

Izolace RNA - speciální přístupy

nutno použít inhibitory RNAsy

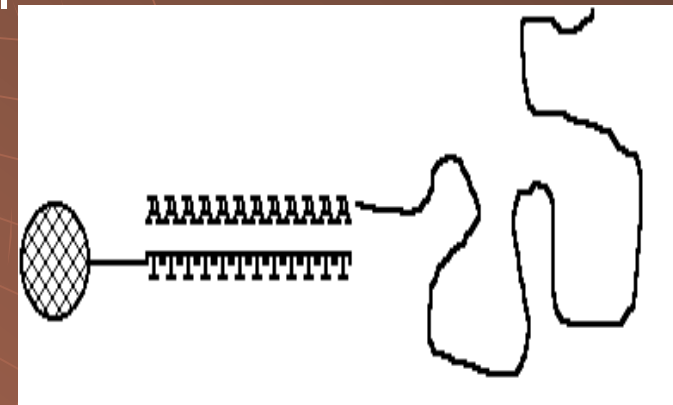
extrakce guanidinium chloridem

fenolová extrakce při $\text{pH} < 4$ ($\text{pH} 8$ pro DNA)

působení RNase-free Dnase

selektivní precipitace rRNA, mRNA s LiCl

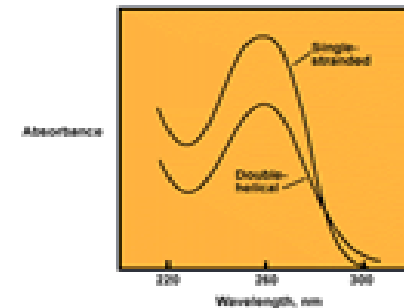
oligo-dT afinitní chromatografie - mRNA



Kontrola čistoty a kvantifikace NK

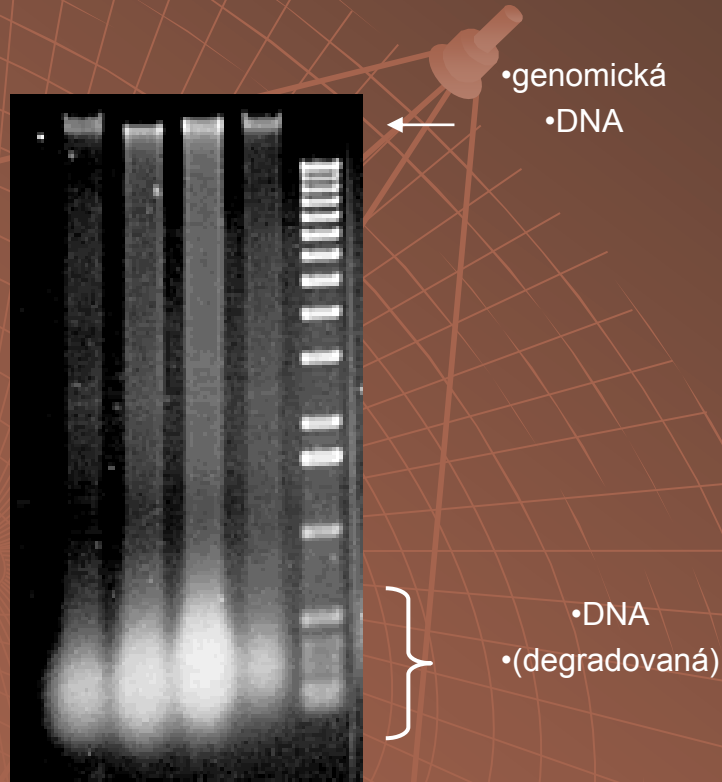
Kontrola NK

- spektrofotometricky
 - kvalita
 - kvantita
- gelová elektroforéza
 - kvalita



DNA	A_{260}	$1.0 \approx 50 \mu\text{g/ml}_{ds} \approx 33 \mu\text{g/ml}_{ss}$
	A_{260}/A_{280}	1.6 - 1.8
RNA	A_{260}	$1.0 \approx 40 \mu\text{g/ml}$
	A_{260}/A_{280}	~ 2.0

Kontrola degradace: DNA



Kontrola degradace: RNA

