

2. cvičení

- PCR amplifikace *hsp60* (*GroEL*)
- Měření čistoty a koncentrace pDNA
 - Štěpení pDNA pBlueScript
- Štěpení pDNA pBlueScript + *hsp60* (*GroEL*)

2. cvičení

- **PCR amplifikace *hsp60***
- Měření čistoty a koncentrace pDNA
 - Štěpení pDNA pBlueScript
- Štěpení pDNA pBlueScript + *hsp60*

Polymerázová řetězová reakce

PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Zavedení PCR v roce **1983 (Kary Mullis)**.

Metoda pro mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku *DNA in vitro* založená na principu **replikace DNA (enzymatické syntézy)** .

Replikace *DNA in vivo* vyžaduje mnoho enzymů

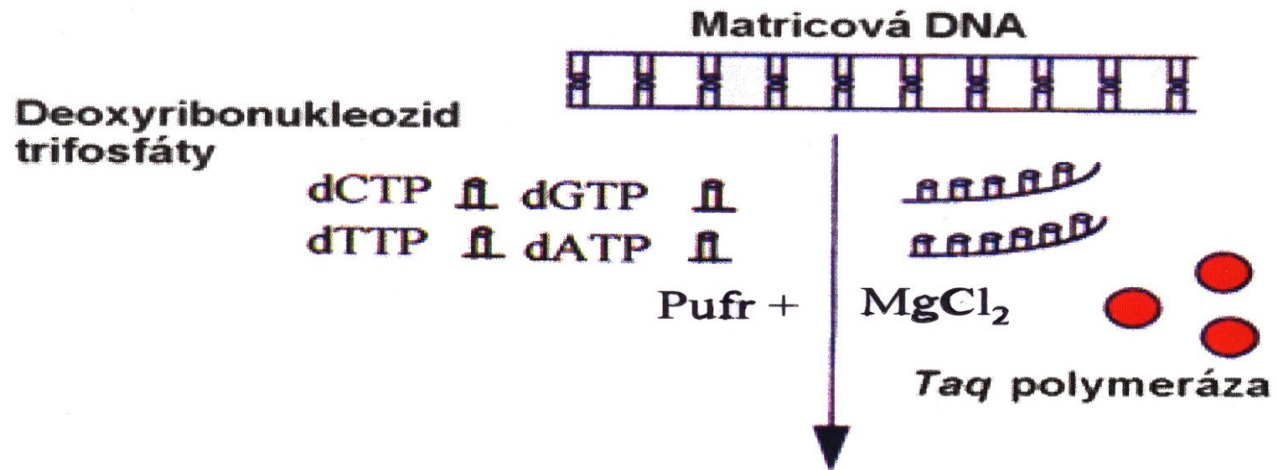
Replikace *DNA in vitro* vyžaduje pouze jeden enzym – polymerázu

Termostabilní DNA polymeráza (aktivní při až 98 °C).

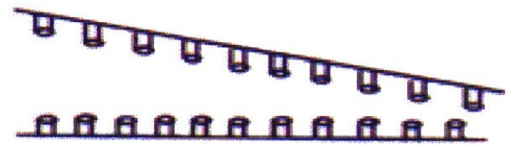
Taq *Thermus aquaticus* (5'-exonukleáza)

Tth *Thermus thermophilus* (5'-exonukleáza)

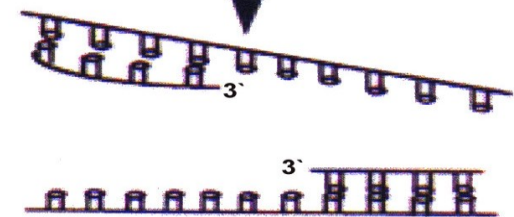
Pwo *Pyrococcus woesei* (3'-exonukleáza)



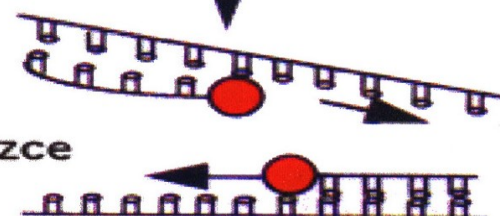
Denaturace DNA
při 94 - 95 °C/1 - 5 min



připojení primerů



Taq polymeráza prodlužuje
komplementární DNA řetězce
z primerů



20 - 30
cyklů

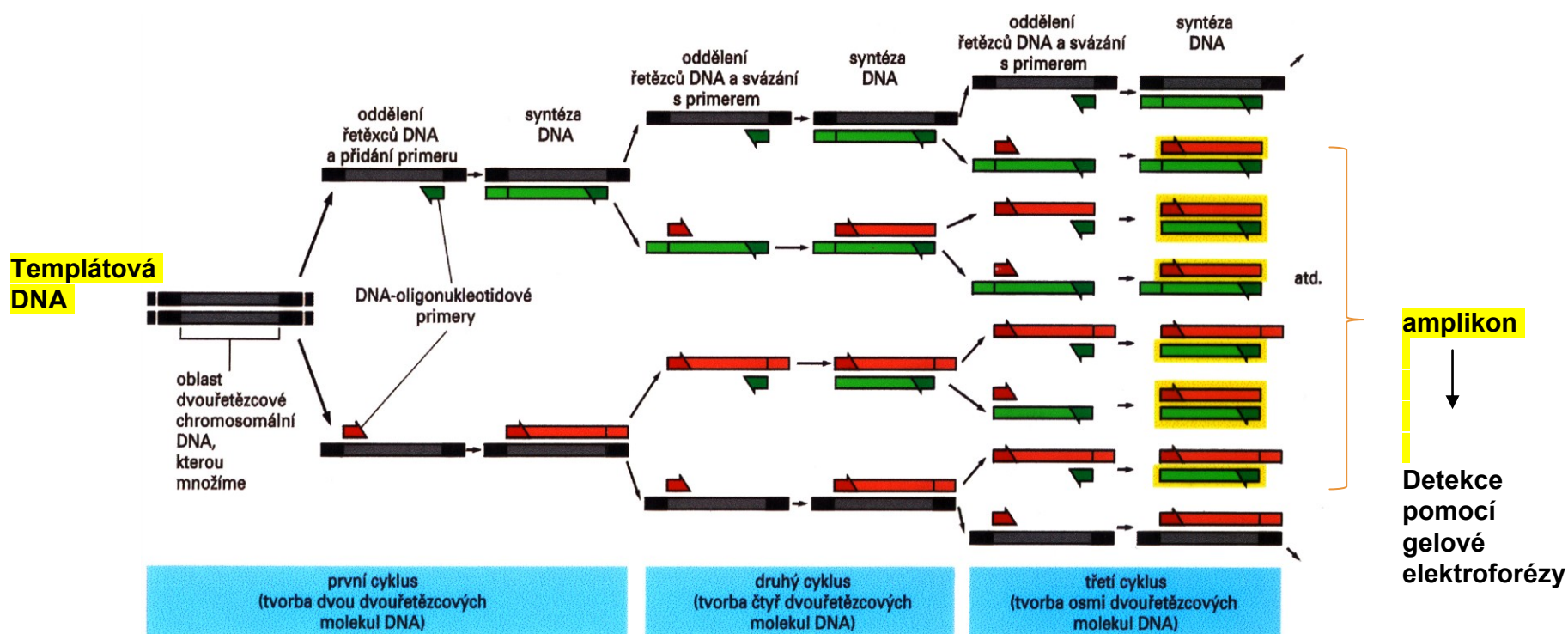
Teplota připojení primerů (annealing):

$$T_a = 2(A+T) + 4(G+C) - 5 \text{ °C} = T_m - 5 \text{ °C}$$

T_m – teplota tání (melting temperature),
tzn. teplota roztoku v inflexním bodě

Inflexní bod – okamžik, kdy je 50 %
molekul denaturováno

1. Jako templát slouží ssDNA (z dsDNA po denaturaci)
2. Na něj nasedají primery: 3'-OH-konce směřují proti sobě.
3. Termostabilní polymeráza vytváří PCR produkt – (amplikon).
4. Nové vlákno DNA je vytvářeno z dNTP ve formě Na⁺ nebo Li⁺ solí
5. Mg²⁺ ionty tvoří rozpustný komplex s dNTP a vytvářejí substrát, který rozpoznává DNA polymeráza.



Teoreticky lze získat 2^n řetězců (kopií).

n = počet cyklů

Využití metod PCR

Základní výzkum

- izolace genů nebo jejich částí
- sekvencování DNA
- mutageneze in vitro
- modifikace konců DNA
- selekce klonů z genových knihoven
- příprava značených sond

Využití v praxi

- archeologie
- soudnictví
- kriminalistika

Aplikovaný genetický výzkum

- prenatální diagnostika (detekce mutací v genech)
- studium polymorfizmu genů
- populační genetika

Využití v klinických disciplínách

- detekce patogenních mikroorganismů
- identifikace onkogenů a typizace nádorů
- stanovení pohlaví

Zásady při přípravě PCR směsi a detekci PCR produktů

1. Při přípravě PCR směsi nejlépe v PCR-boxu je nutno používat ochranné rukavice (**zabránit kontaminaci vzorku**).
2. Polymeráza musí být vždy na ledu (v chlazeném stojánku), ostatní reagencie se nechají roztát při 25°C.
3. **Reagencie a obzvláště primery nabírat jen vhodnou sterilní špičkou.**
4. Po použití musí být reagencie urychleně uschovány při teplotě -20°C.
5. Pipety a plasty k tomu určené jsou vyčleněny pouze pro PCR.
6. Nejprve se pipetuje do zkumavky voda, jako **poslední polymeráza.**
7. Používat PCR vodu, ta je sterilní a bez DNáz, následně rozpipetovaná do mikrozkušavek a uložena v mrazničce.
8. **Vždy přidávat kontroly: pozitivní k. (známý templát), negativní k. (voda místo templátové DNA)**
9. **Pipetovat pod hladinu, vizuálně kontrolovat správný objem v pipetě.**

- PCR box (místnost), určená pro PCR reakce, je pravidelně svícena UV zářením a pracovní plochy se omývají dezinfekčním prostředkem.
- Zde nikdy nepracovat s templátovou DNA a PCR produkty (amplikony).
- Detekce amplifikovaných sekvencí se provádí v jiné místnosti, vybavené pro elektroforézu.



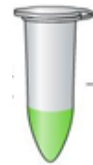
Protokol PCR - Amplifikace genu *hsp60* (*GroEL*)

Složky reakční směsi	Zásobní koncentrace	Výsledná koncentrace	Množství v 25 μ l / 1 vzorek	Množství v μ l / X vzorků
H ₂ O pro PCR			14,8 μ l	
Pufř pro PCR s MgCl ₂	10 \times	1 \times	2,5 μ l	
MgCl ₂	25 mM	0 mM	0 μ l	
dNTP	2 mM	200 μ M	2,5 μ l	
Primery: H279 H280	10 μ M	0,4 μ M každý	1 μ l 1 μ l	
<i>Taq</i> DNA-polymeráza	5 U μ l ⁻¹	1 U	0,2 μ l	
Templátová DNA	100 \times řed.	50 ng	3 μ l	

Poč. denaturace	teplota 95°C	doba trvání 30s	
Denaturace	94°C	30s	} 30 x
Nasedání primerů (annealing)	54°C	30s	
Produžování primerů (extenze)	72°C	50s	
Závěrečná extenze	72°C	3min	

Templátová DNA:

- *Staphylococcus aureus* 50x ředěná DNA
- Negativní kontrola H₂O



22 μ l MM/vzorek
+ 3 μ l DNA (řed.)

Směs pro PCR, tzv. master-mix (H₂O, pufř, MgCl₂, dNTP, polymeráza, primery), smíchat pro všechny vzorky, pak rozplnit do PCR zkumavek po 22 μ l a přidat 3 μ l dsDNA (vzorek), případně vody (negativní kontrola). Při přípravě se počítá s jedním rezervním vzorkem pro případ chyby pipetování.

2. cvičení

- PCR amplifikace *hsp60*
- **Měření čistoty a koncentrace pDNA**
 - Štěpení pDNA pBlueScript
 - Štěpení pDNA pBlueScript + *hsp60*

Stanovení koncentrace a čistoty DNA

SPEKTROFOTOMETRICKÁ METODA

- Je to vhodná metoda pro měření vzorků nukleových kyselin, které jsou dostatečně čisté bez významného množství kontaminant.
- Nukleové kyseliny absorbují **UV** záření s maximem absorbance v oblasti vlnové délky okolo **260 nm**.
- Z hodnot optické hustoty lze koncentraci a čistotu vzorku stanovit podle empirických vztahů.

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

množství světla
vcházejícího

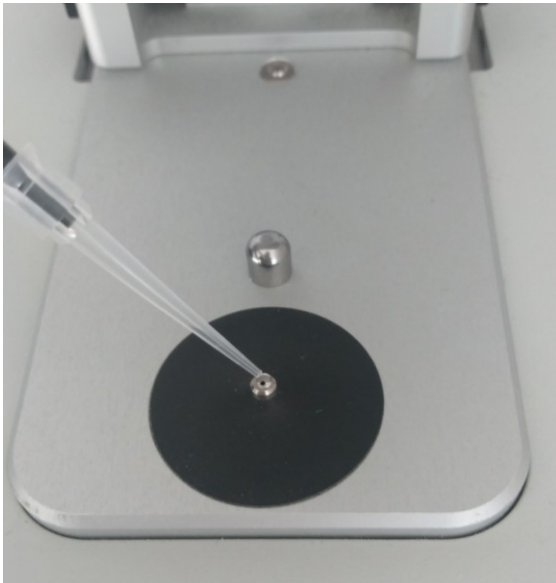
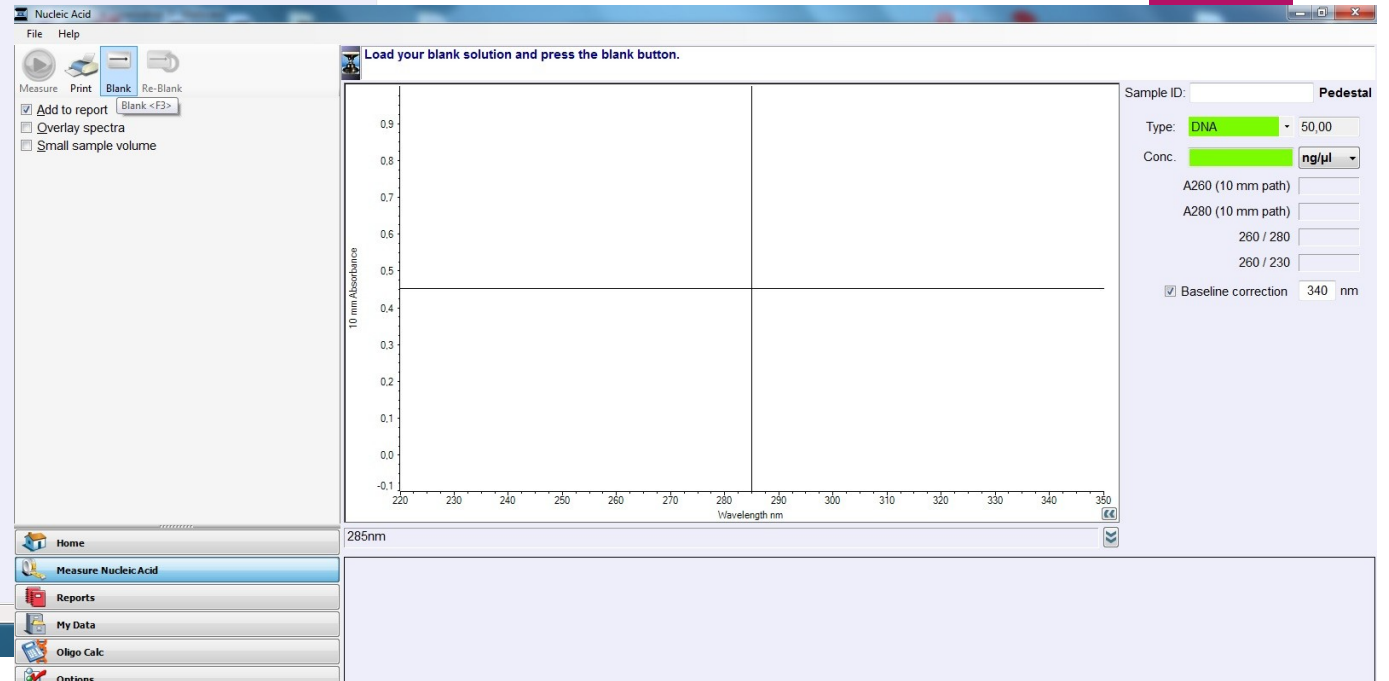
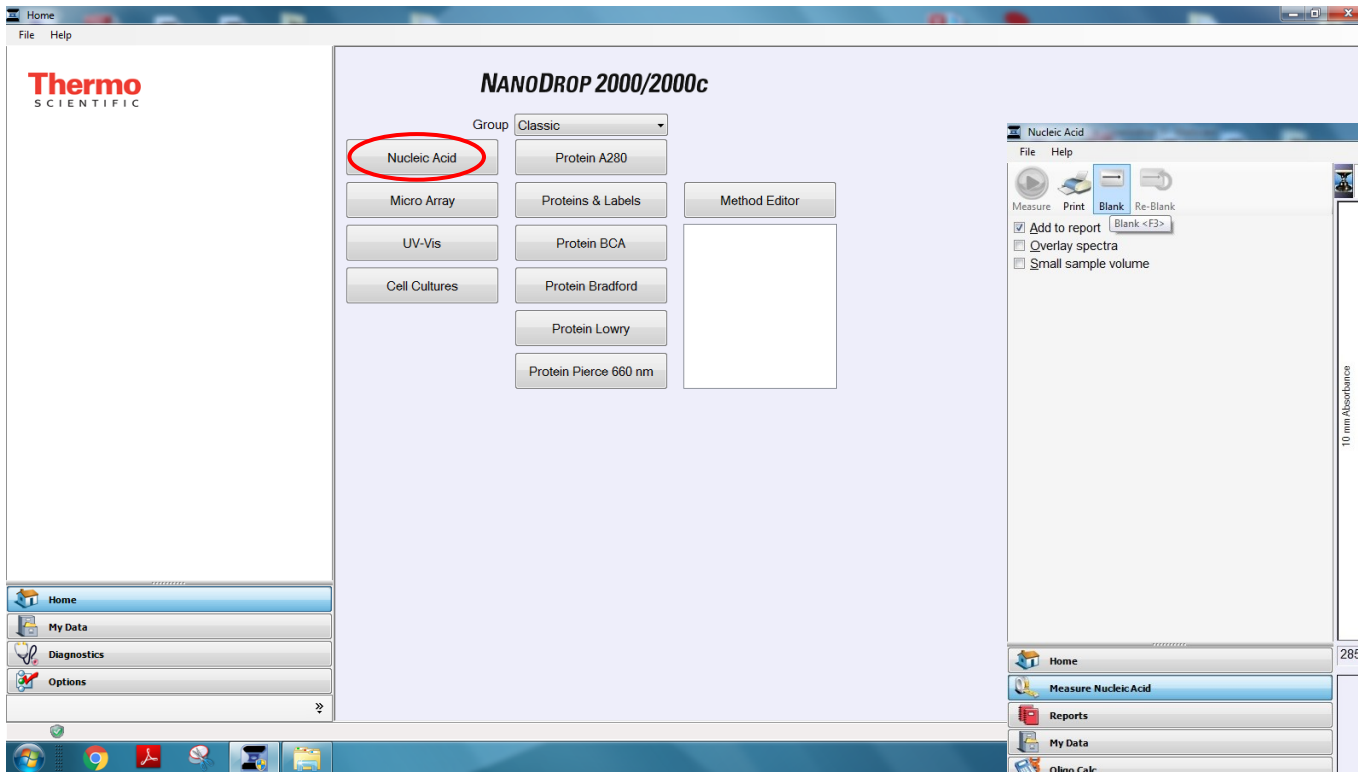
množství světla
propuštěného



NanoDrop 2000-Spectrophotometer

Výhody:

- objem měřeného vzorku je pouze 2μl
- šetří vzorek pro experimenty – výhoda oproti kyvetovým spektrofotometrům
- xenonová výbojka stačí pro cca 30 000 stanovení



1. Voda (očistění), otřít
2. Blank (kalibrace, pozadí vzorku), otřít
3. Vzorek (-y), otřít
4. Voda (očistění), otřít

Objem vždy **2μl**

křivka absorbance pro různé vlnové délky hodnota koncentrace

specifické poměry absorbancí
čistota vzorku

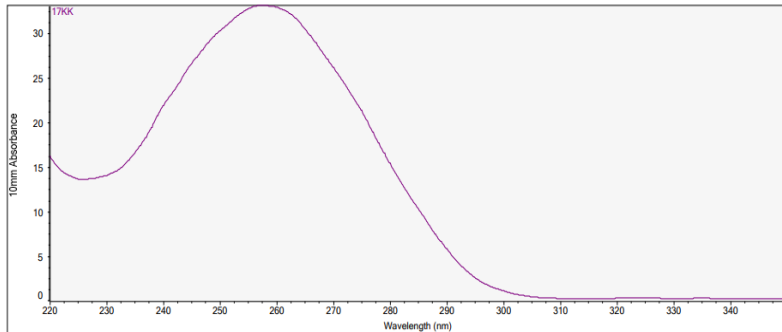
The screenshot shows the 'Nucleic Acid' software interface. The main window displays a graph of 10mm Absorbance versus Wavelength (nm) from 220 to 350 nm. The curve shows a peak at approximately 260 nm. A red arrow points to the curve. The right panel shows measurement parameters for Sample ID 10, Type DNA, and Concentration 2660.5 ng/μl. Below the graph, a table lists individual measurement records.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	1	MU	24.3.2020 15:15	2144,4	ng/μl	42,888	20,173	2,13	2,28	DNA	50,00
2	2	MU	24.3.2020 15:16	3918,0	ng/μl	78,360	36,912	2,12	2,31	DNA	50,00
3	3	MU	24.3.2020 15:16	132,7	ng/μl	2,654	1,264	2,10	1,33	DNA	50,00
4	5	MU	24.3.2020 15:17	132,5	ng/μl	2,650	1,306	2,03	1,29	DNA	50,00
5	6	MU	24.3.2020 15:18	2450,1	ng/μl	49,003	23,415	2,09	2,24	DNA	50,00
6	7	MU							2,27	DNA	50,00
7	10	MU							2,26	DNA	50,00

Záznamy jednotlivých měření

Vyhodnocení naměřených hodnot

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
13	17KK	LMDM	22. 3. 2018 13:47:55	1643,2	ng/ul	32,865	15,251	2,15	2,36	DNA	50,00



- **Stupeň čistoty** nukleových kyselin se stanovuje z poměru absorbance při 260 a 280 nm.
- Pro čistou **DNA** platí: $A_{260}/A_{280} = 1,80$ až $1,85$
- Pro čistou **RNA** platí: $A_{260}/A_{280} = 2,0$

proteiny a aromatické látky $< 1,85 <$ reziduum RNA

Případné přečištění vzorku:

- **odstranění fenolu:**
extrakce chloroformem
- **odstranění proteinů:**
opakovaná deproteinace chloroformem, nebo enzymová degradace proteinů pomocí pronázy nebo proteinázy
- **odstranění RNA:**
enzymová degradace pomocí RNázy nebo specifické precipitační postupy

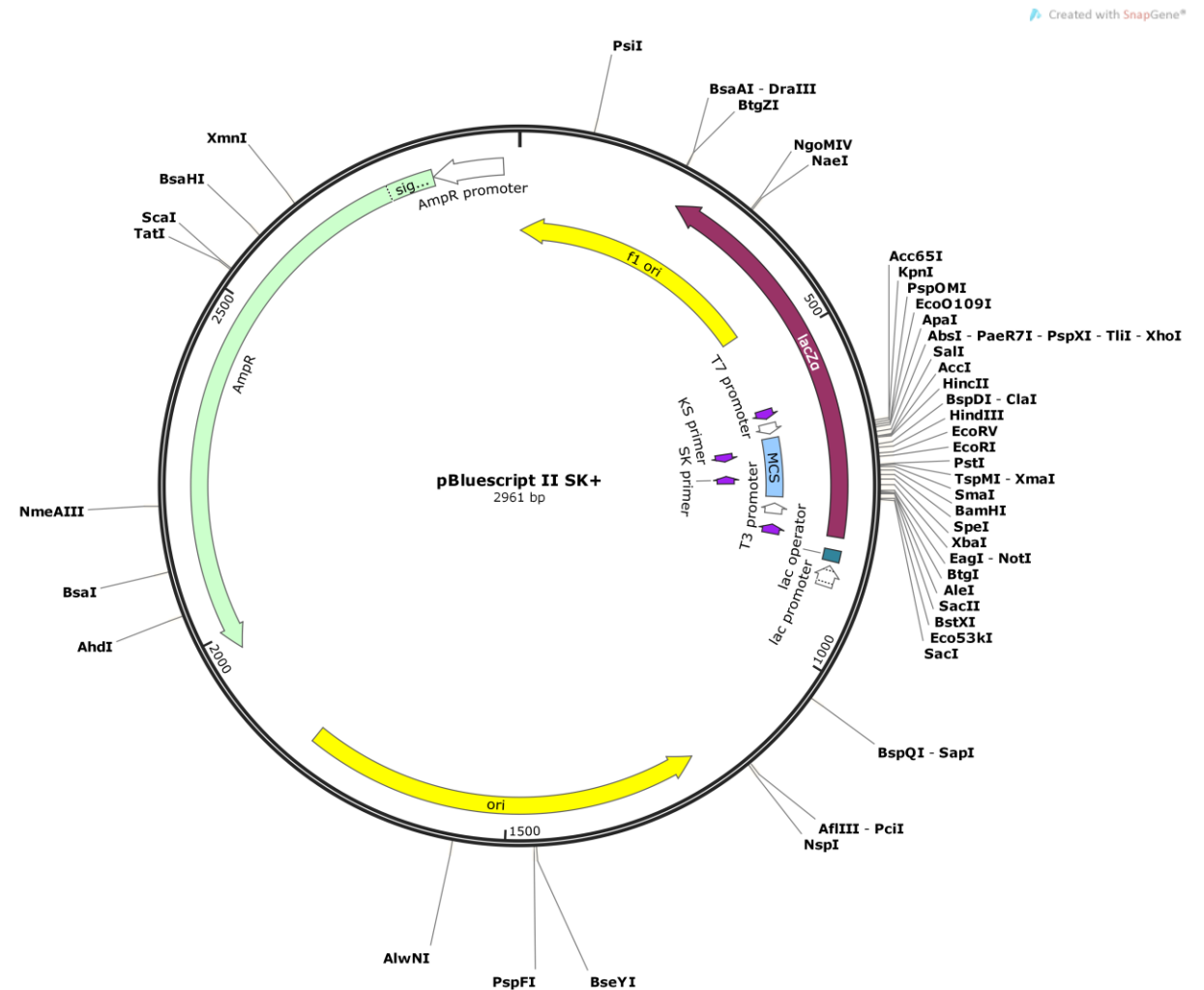
2. cvičení

- PCR amplifikace *hsp60*
- Měření čistoty a koncentrace pDNA
 - Štěpení vektoru pBlueScript
- Štěpení rekombinantního vektoru pBlueScript + *hsp60*

Štěpení DNA restrikčními endonukleázami - linearizace vektoru a úprava konců vektoru a inzertu

- sekvence rozpoznávané restrikčními enzymy leží v **polylinkeru** (MCS = multiple cloning site)
- polylinker obsahuje několik restrikčních míst pro různé restrikční endonukleázy
- v tomto místě dochází k rozštěpení a následné ligaci s lineárním inzertem, jehož konce jsou štěpeny stejnými restrikázami jako vektor
- po ligaci se recirkularizuje rekombinantní vektor

= vektor + inzert



Působení restrikčních enzymů - Typy RE: I, II, III a IV

TYPES AND ACTIVITIES OF RESTRICTION ENZYMES

Type I

Cleaves DNA at random sites far from its recognition sequence

Type II

Cleaves DNA at defined positions close to or within its recognition sequence

Type IIG

Cleaves outside its recognition sequence with both REase and MTase enzymatic activities in the same protein

Type IIP

Cleaves symmetric targets and cleavage sites

Type IIS

Recognizes asymmetric sequences

Type III

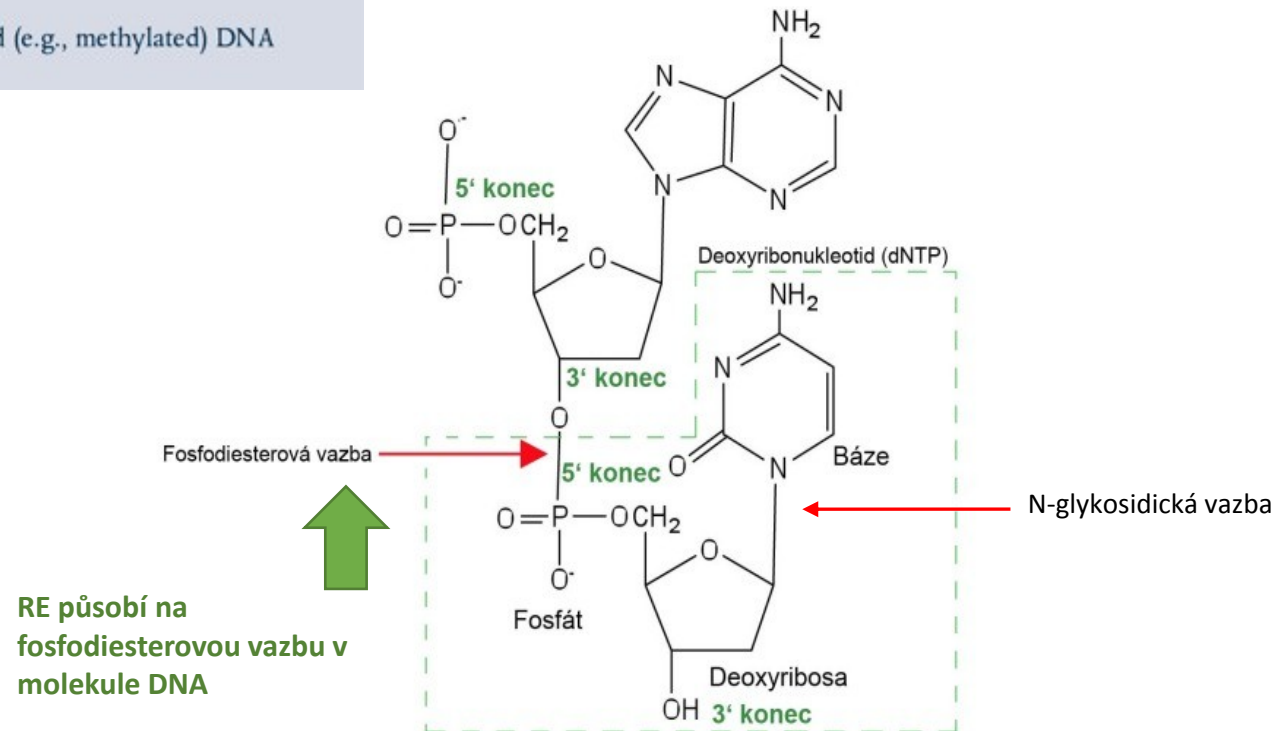
Cleaves outside its recognition sequence and require two sequences in opposite orientations within the same DNA

Type IV

Cleaves modified (e.g., methylated) DNA

Přirozená funkce:

- odbourávání cizorodé DNA (např. fágy, plazmidy) (ochrana vlastní DNA pomocí metylace)



Původ: produkty bakterií

Název: rod/druh/kmen/serotyp

EcoRI (*Escherichia coli* kmen R, pořadové číslo 1)

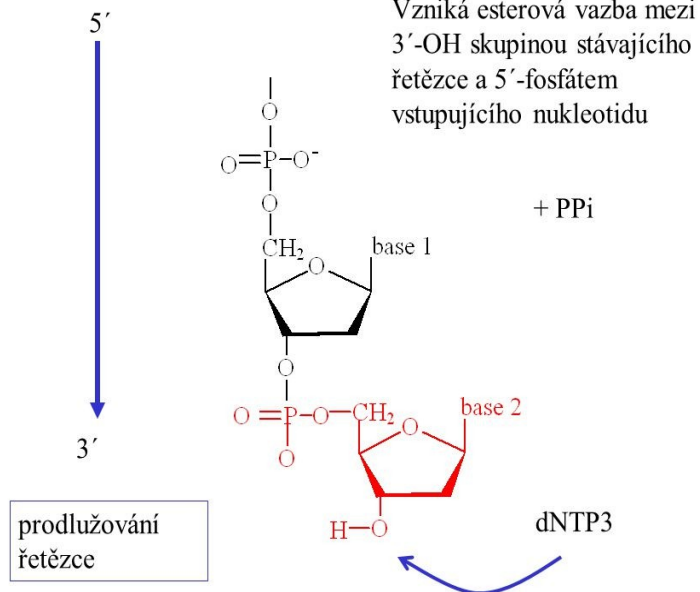
Aktivita enzymu je

- závislá na teplotě
- závislá na typu substrátu
- závislá na čase
- závislá na chemických faktorech (druh pufru)
- závislá na koncentraci (U)

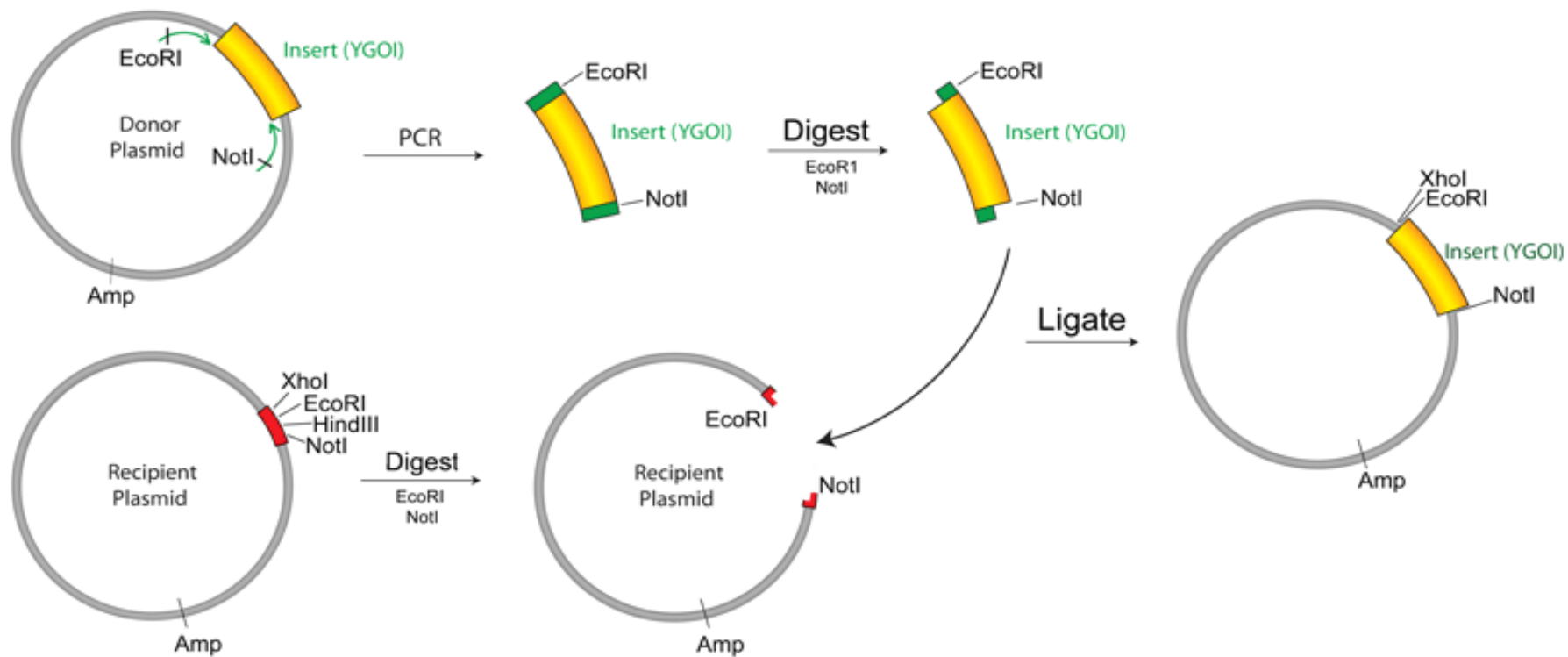
RE-fragmenty dsDNA

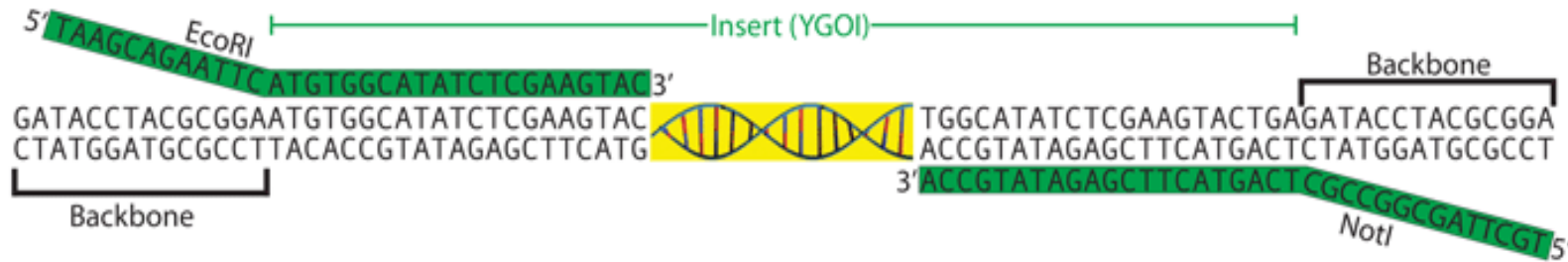
3 typy RE-fragmentů:

- a) s tupými konci
- b) přesahujícími 5` - konci
- c) **přesahujícími 3` - konci**



Návrh primerů s adaptory pro RE





Forward primer:

1. Návrh primeru (18-21 bp, začíná iniciačním kodónem **ATG**)

5'-**ATG**TGGCATATCTCGAAGTAC-3'

2. Výběr vhodné restriktázy ([Addgene: Analyze Sequence](#))

EcoRI restriction site (**GAATTC**)

5'-**GAATTC**ATGTGGCATATCTCGAAGTAC-3'

3. Přidat volné nukleotidy pro optimální štěpení (3-6 nt) ([Cleavage Close to the End of DNA Fragments | NEB](#))

TAAGCA

5'-**TAAGCA****GAATTC**ATGTGGCATATCTCGAAGTAC-3'

Reverse primer:

1. Návrh primeru (18-21 bp, začíná stop kodónem **TAA**)

3' - GCATGCCAGGAATGATG**TAA** - 5'

- reverzně komplementárně <http://reverse-complement.com/>

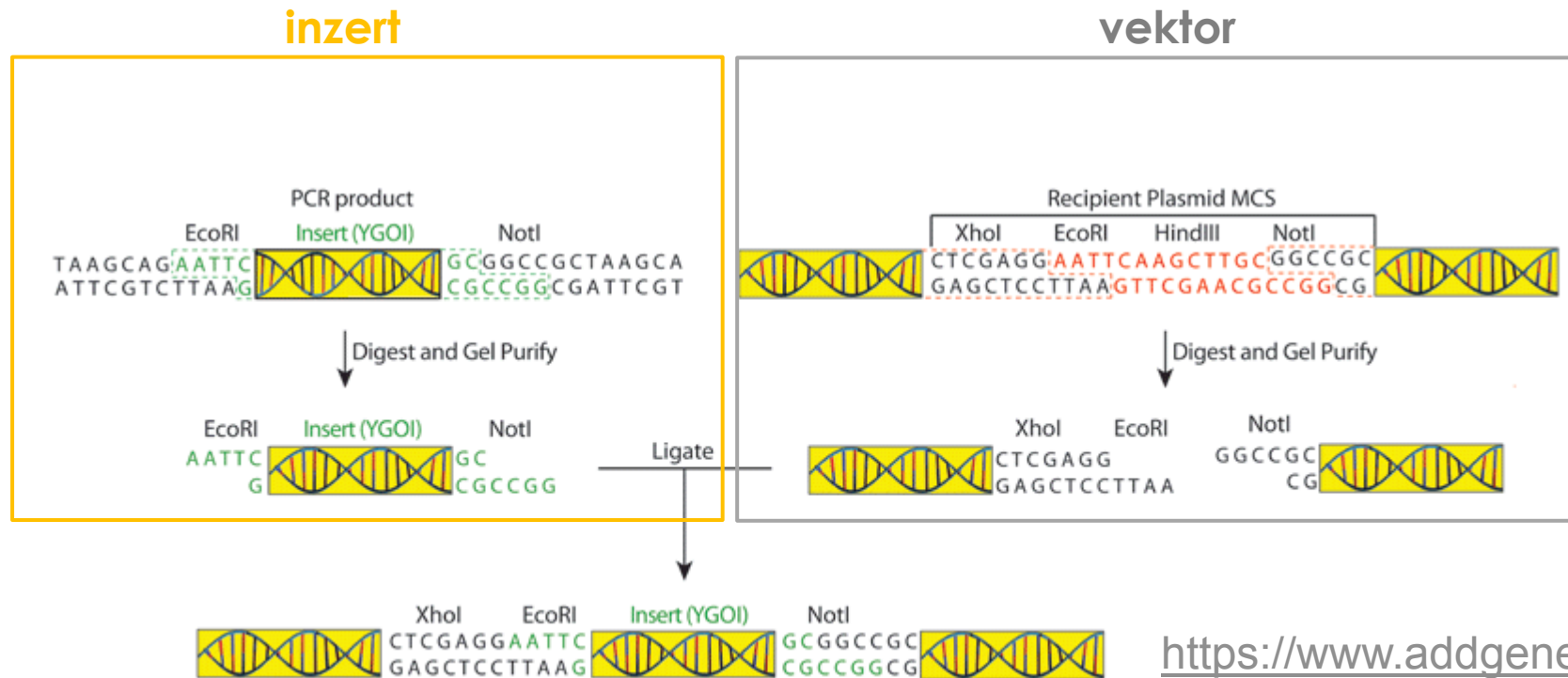
5'- **TTA**CATCATTCTGGCATGC-3'

2. Výběr vhodné restriktázy + přídatné nukleotidy
EcoRI restriction site (**GAATTC**)
přídatné nukleotidy **TAAGCA**

reverzně komplementárně

5'- **TGCTTA****GAATTC****TTA**CATCATTCTGGCATGC-3'

Klonování do plazmidového vektoru pomocí restriktáz



<https://www.addgene.org/protocols/pcr-cloning/>

Příprava štěpící směsi – dsDNA pBluescript

20 μ l

16 μ l DNA (c = 300 μ g/ml)

2 μ l restrikčního pufru

2 μ l *Eco*RI 3 U/ μ l

Postup:

1. do sterilní Epp. zkumavky připravit 20 μ l štěpící směsi
2. mžiková centrifugace
3. inkubace při 37 C / 2 hod.
4. zastavit reakci 70 C / 10 min.

Jednotka enzymu (U) = množství RE, které rozštěpí 1 μ g dsDNA (obvykle DNA fága λ) za 1 hod. při optimální teplotě a optimálních podmínkách uvedených pro každou RE

Mapování DNA genomu pomocí restričních endonukleáz

Restriční mapa fága 3A

= znázorňuje počet restričních fragmentů DNA, získaných štěpením různými restriktázami, a jejich uspořádání v genomu

Na mapě jsou vyznačená místa štěpení restriktázami a poloha jednotlivých restričních míst v genomu

Vzdálenost RE míst je dána velikostí fragmentu DNA (v bp) mezi dvěma sousedními **RE-místy**

