

ANALÝZA A SEPARACE NUKLEOVÝCH KYSELIN


LITERATURA

GENE CLONING & DNA ANALYSIS

AN INTRODUCTION

SIXTH EDITION

T.A. BROWN

 WILEY-BLACKWELL

Materiál chráněný autorskými právy

MUNI
SCI

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)

NEJPOUŽÍVANĚJŠÍ METODY

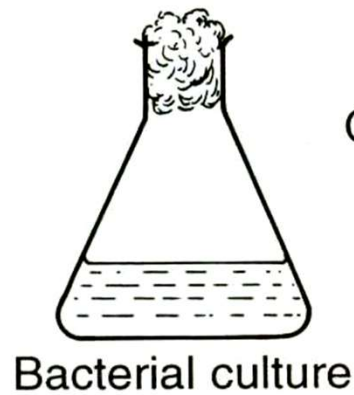
- na základě rozdílné rozpustnosti – extrakce, srážení
- na základě vlastností - chromatografie – polarita-adsorpční, náboj-ionexová
- sedimentace - gradientová ultracentrifugace

POSTUP

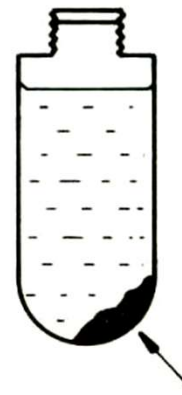
1. Rozbití buněk a membrán pro uvolnění NK
2. Inaktivace DNA- nebo RNA-degradujících enzymů (DNasy, RNasy).
3. Separace NK od dalších komponent uvolněných z buňky.
 - Extrakce/Precipitace
 - Chromatografie
 - Ultracentrifugace

EXTRAKCE/PRECIPITACE

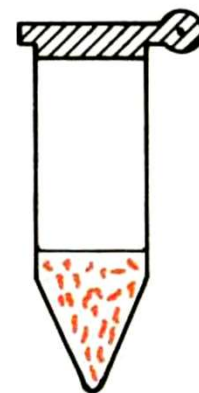
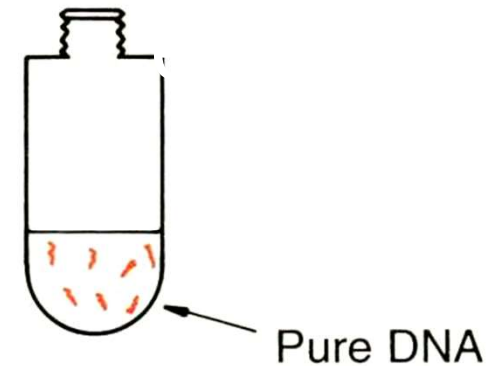
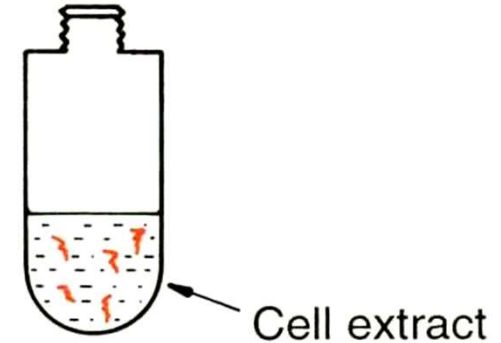
1 A culture of bacteria is grown and then harvested



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

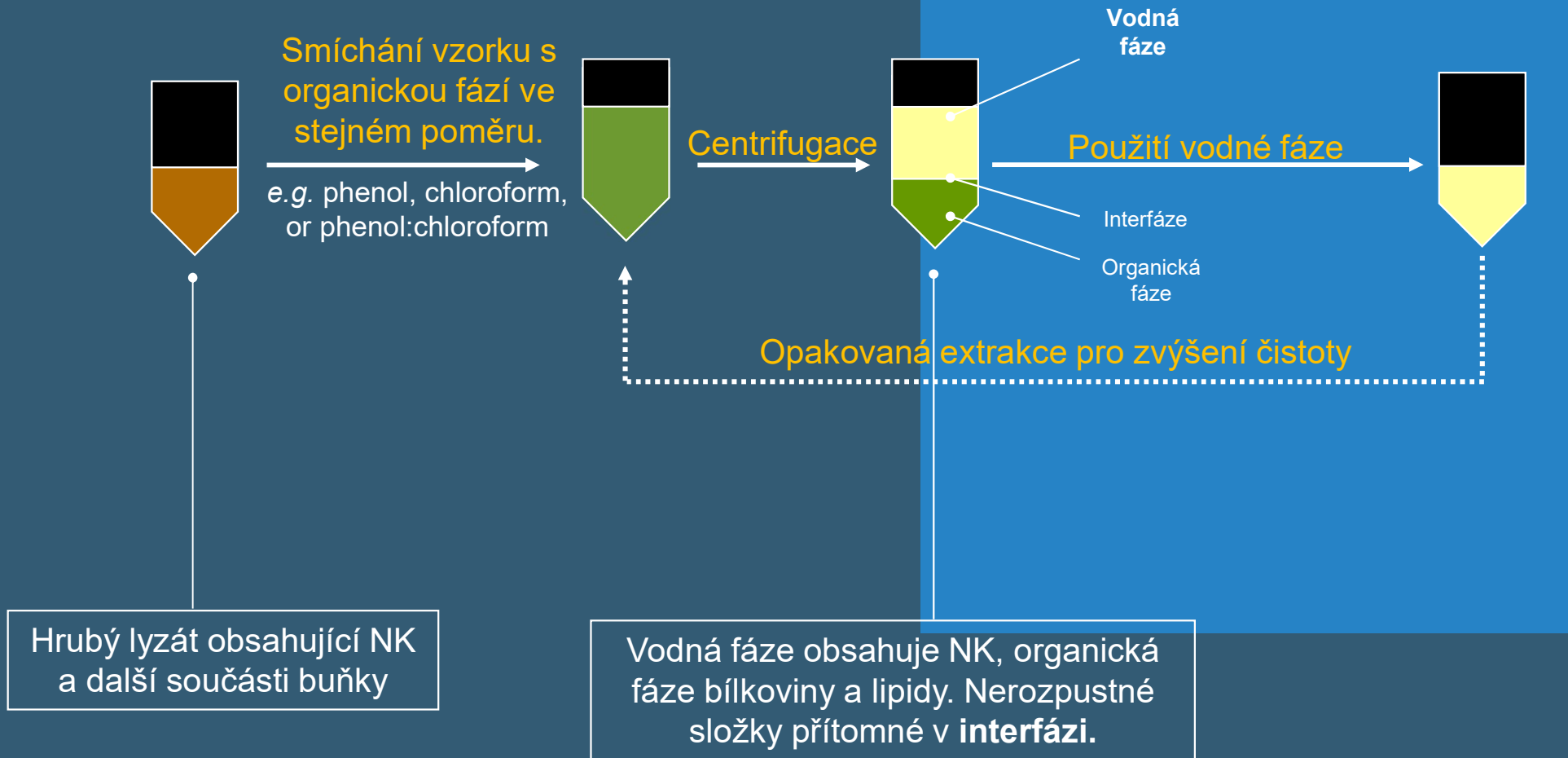
4. *Ethanolová precipitace*

5. *Působení RNAsy a proteinasy K*

6. *Opakování kroku 3 a 4.*

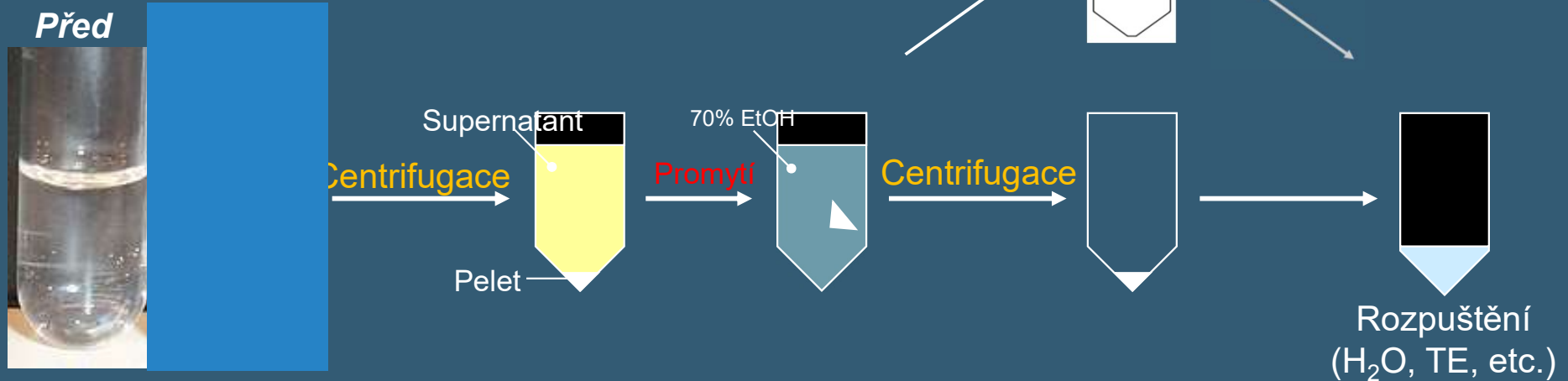
Extrakce/Precipitace

Krok 3: Organická extrakce



Extrakce/Precipitace

Krok 4: Precipitace NK

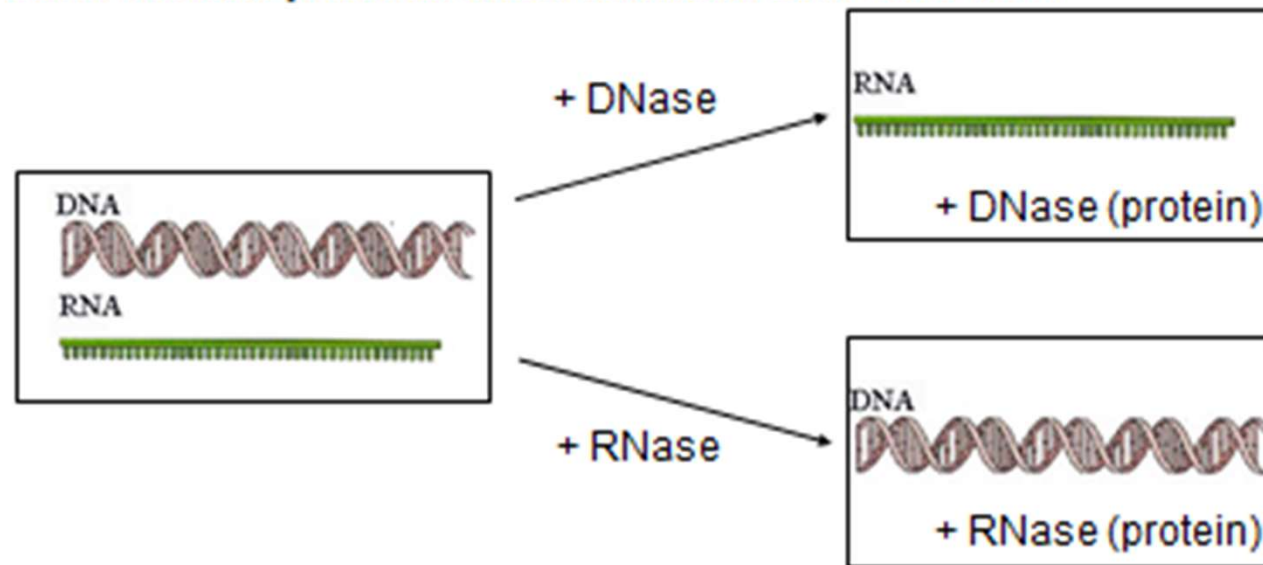


Přidání EtOH a soli
2-2,5 objem EtOH
-20° C
Vysoká I
pH 5-5.5

Krok 5: Působení RNAsy

Detail kroku 5

Použití nukleas pro odstranění nechtěné DNA nebo RNA



CHROMATOGRAPHIE

Adsorpční chromatografie

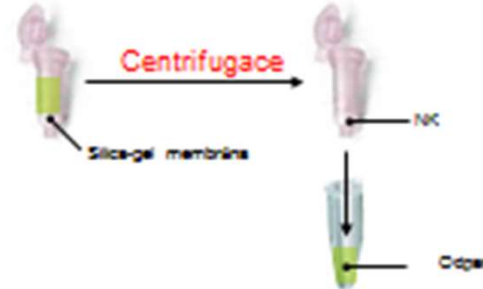
Adsorpční chromatografie

Krok 1: Příprava lyzátu



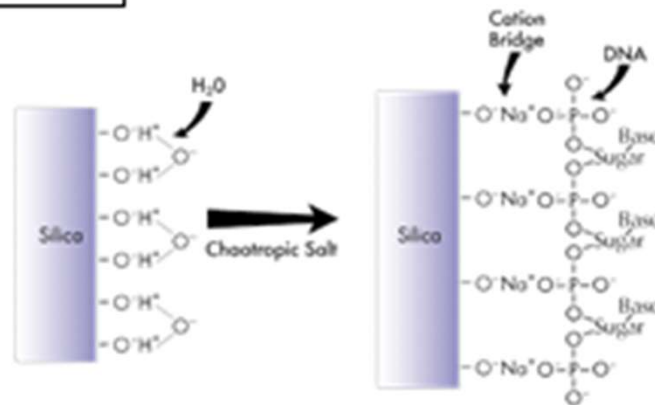
Aplikace na
kolonku

Krok 2: Adsorpce na silikagel



Extrakční pufr pro vazbu DNA a
RNA na silikagel:

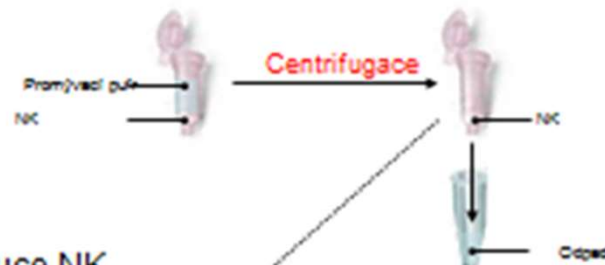
- nízké pH
- vysoká iontová síla
- chaotropní soli



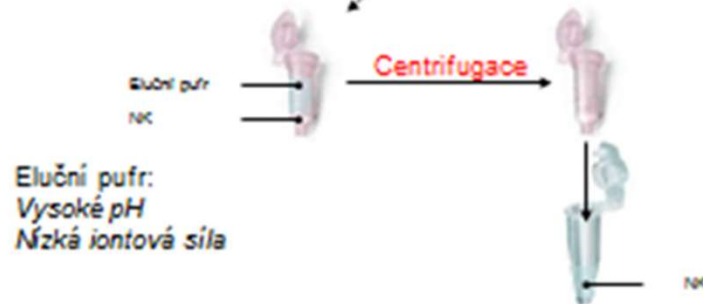
ADSORPČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Adsorpční chromatografie

Krok 3: Vymytí kontaminant

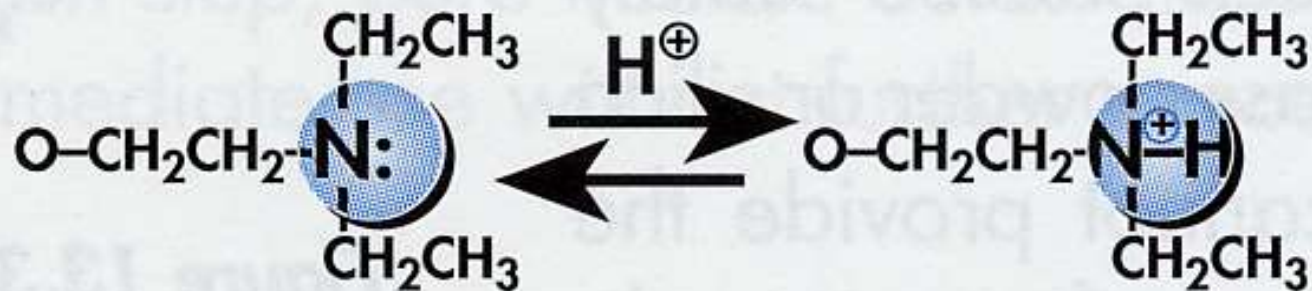


Krok 4: Eluce NK



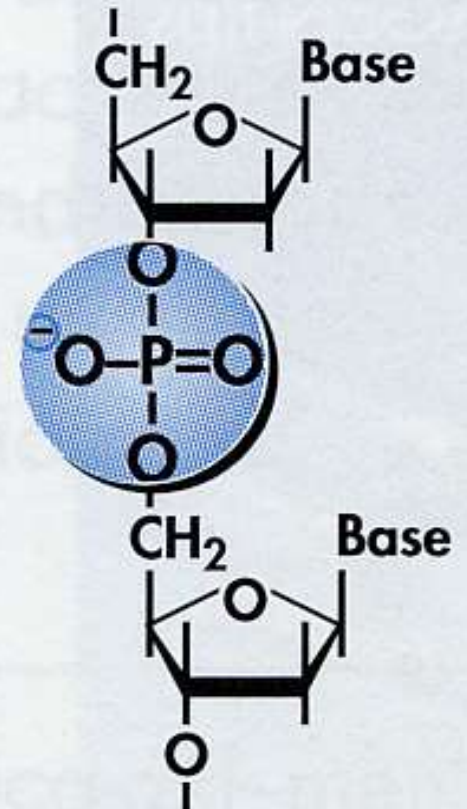
Ionexová chromatografie

Vazba při nízkém pH nízké I



Eluce zvýšením pH nebo vysokou I

DEAE (diethylaminoethanol)



Chemical structure
of DNA

GRADIENTOVÁ CENTRIFUGACE

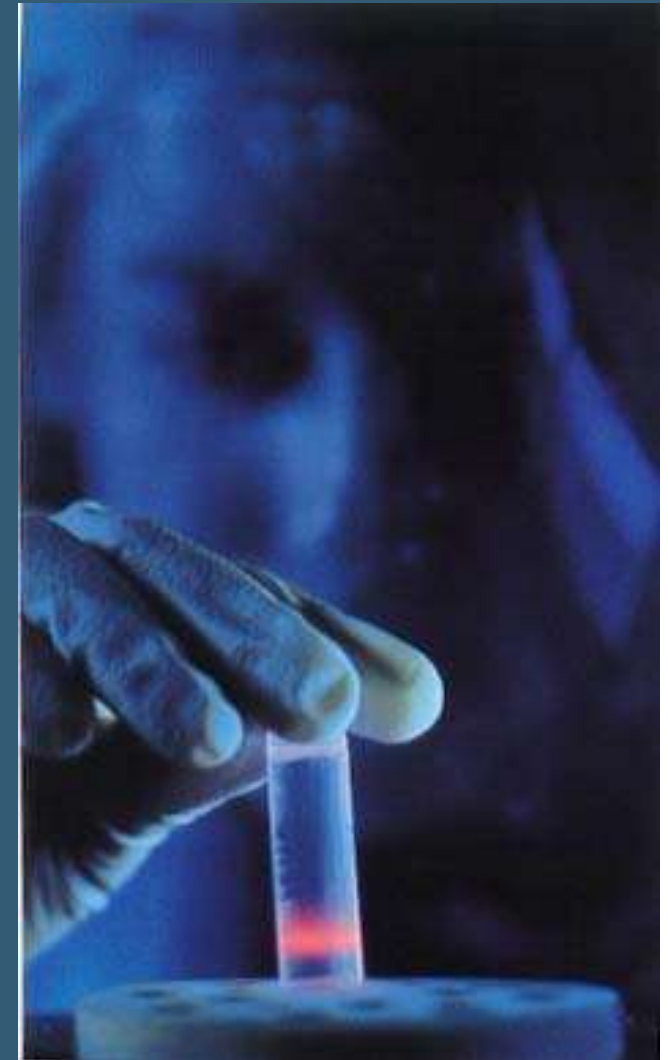
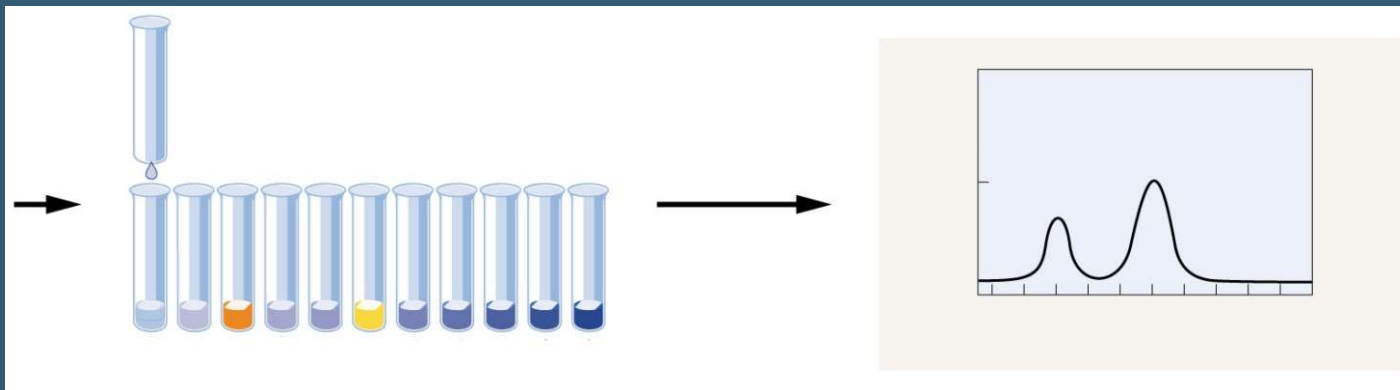
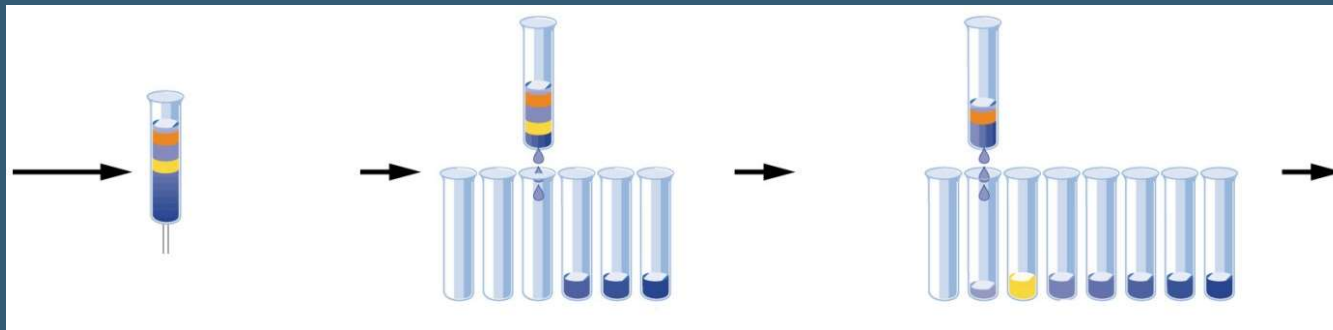
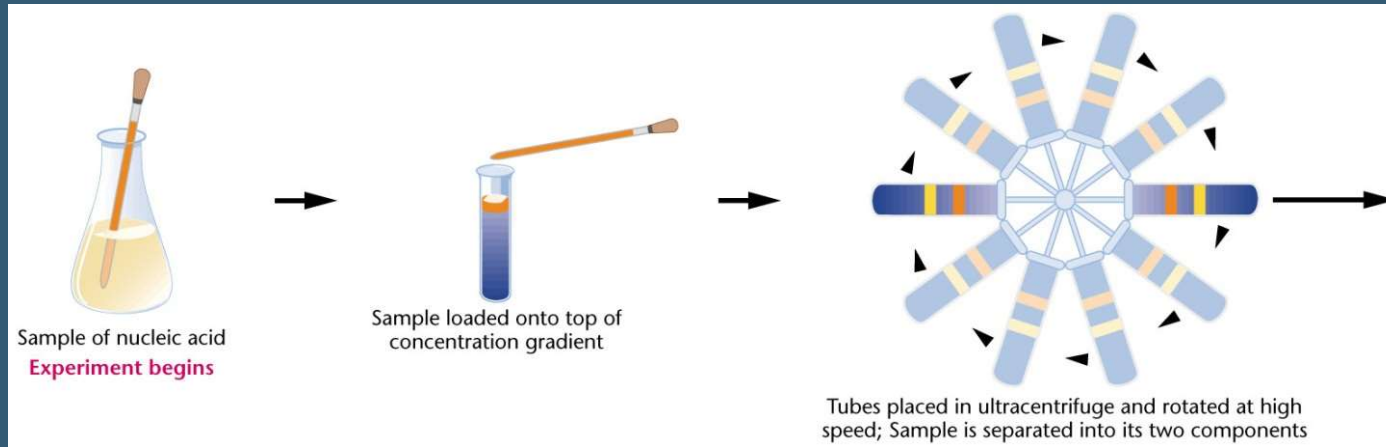
Dělení částic lišící se navzájem svou velikostí (molekulární hmotností), probíhá pomocí centrifugace v tzv. sacharózových gradientech, tj. v roztocích sacharózy, jejichž koncentrace u dna centrifugační zkumavky je vyšší než u hladiny (**lineární gradienty 5 - 20% sacharózy**). Vzrůstající hustota roztoku a tím i jeho viskozita eliminují odstředivé zrychlení působící na částice, jehož hodnota se směrem od osy otáčení zvyšuje. Gradient tak zajišťuje konstantní rychlost sedimentace částic, podmiňuje jejich stabilitu a snižuje difúzi usazených částic do okolí. K přípravě gradientů lze použít rovněž dalších látek, např. D 2O, ficoll aj.

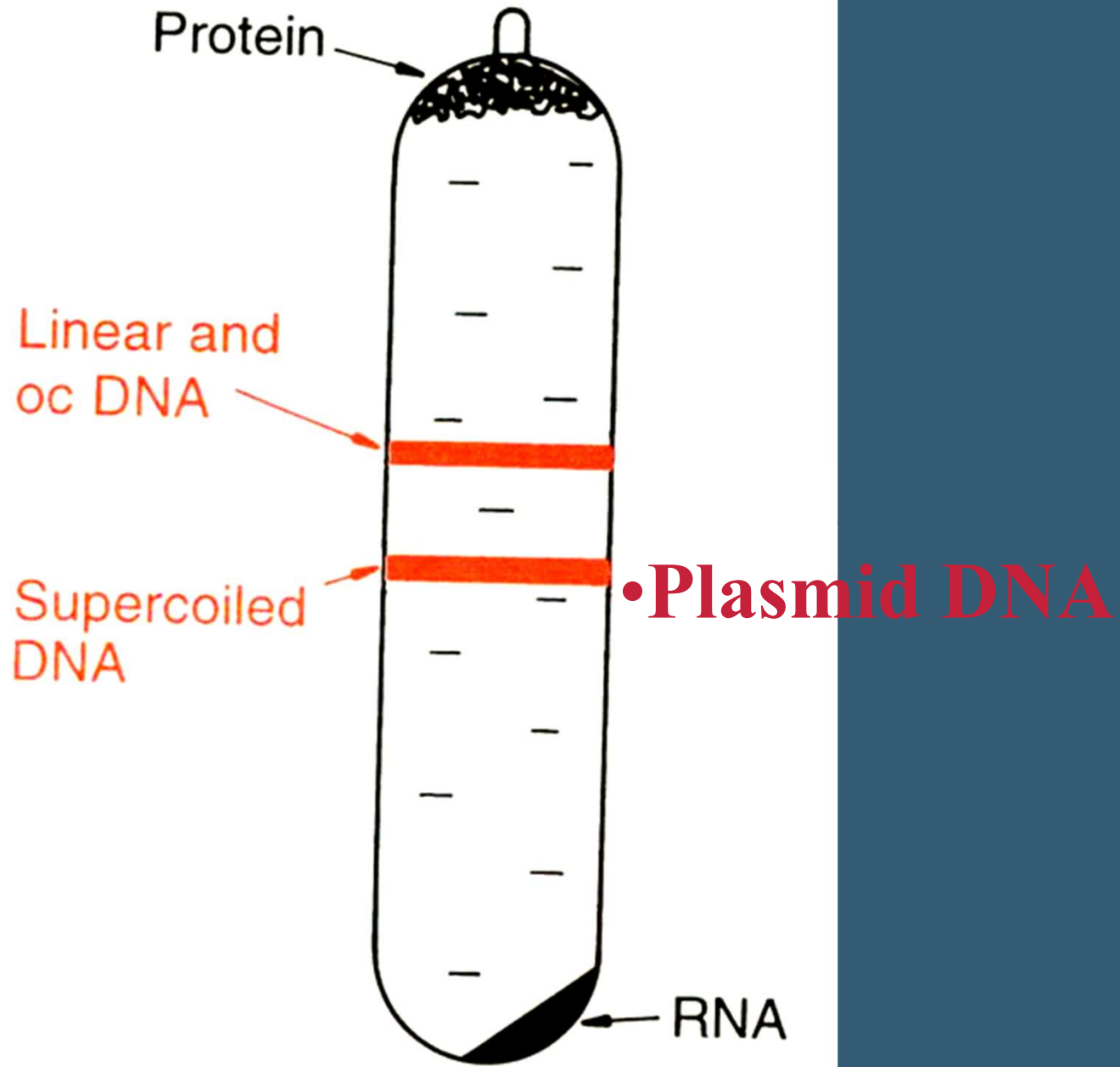
Používá se gradientů chloridu cesného – dělení dle odlišné **specifické hustoty**. Roztoky CsCl se vyznačují vysokou hustotou a při centrifugaci samovolně vytvářejí koncentrační a tím i hustotní gradient.

Gradient je určen počáteční koncentrací CsCl a rychlostí otáčení. K ustálení gradientu dojde během několika hodin.

MUNI
SCIT
Biomakromolekuly, které se na počátku centrifugace promíchají s roztokem CsCl, se při centrifugaci usadí ve vrstvě roztoku (gradientu), odpovídající jejich vznášivé hustotě (její hustota je poněkud odlišná od specifické hustoty).

Gradientová centrifugace DNA CsCl





(a) An EtBr-CsCl density gradient

IZOLACE RNA - SPECIÁLNÍ PŘÍSTUPY NUTNO POUŽÍT INHIBITORY RNASY

extrakce guanidium chloridem

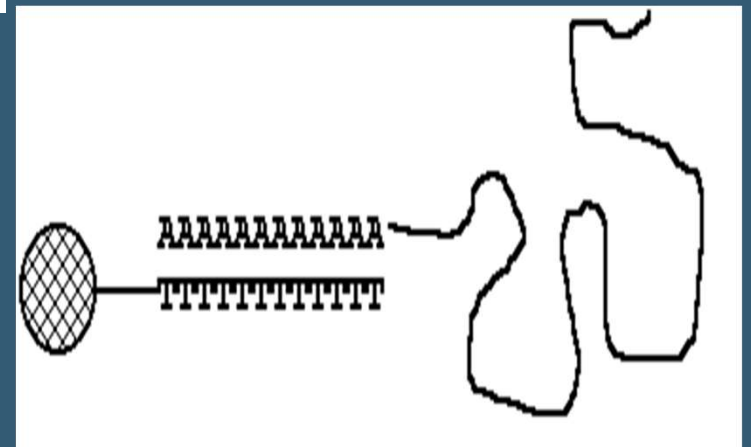
fenolová extrakce při $\text{pH} < 4$ ($\text{pH} 8$ pro DNA)

působení RNase-free Dnase

selektivní precipitace rRNA, mRNA s LiCl

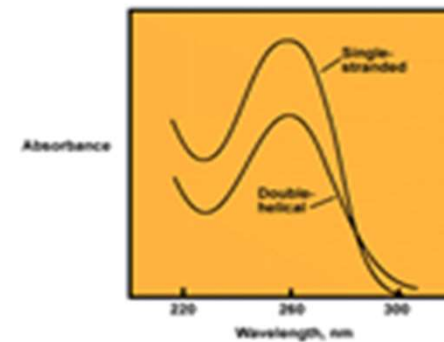
oligo-dT afinitní chromatografie - mRNA

MUNI
SCI



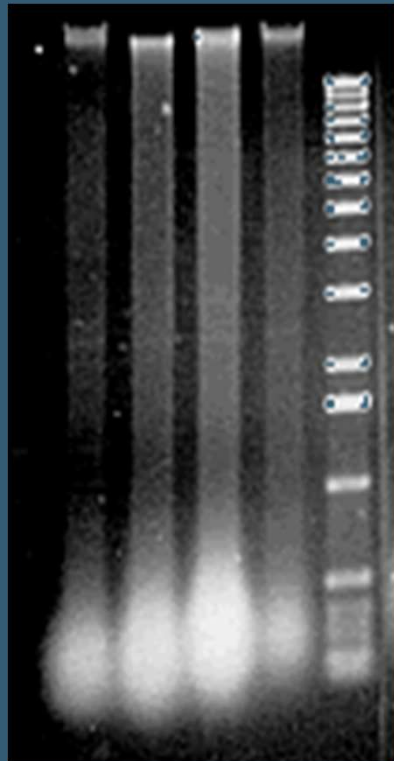
Kontrola NK

- spektrofotometricky
 - kvalita
 - kvantita
- gelová elektroforéza
 - kvalita



DNA	A_{260}	$1.0 \approx 50 \mu\text{g/ml}_{\text{ds}} \approx 33 \mu\text{g/ml}_{\text{ss}}$
	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

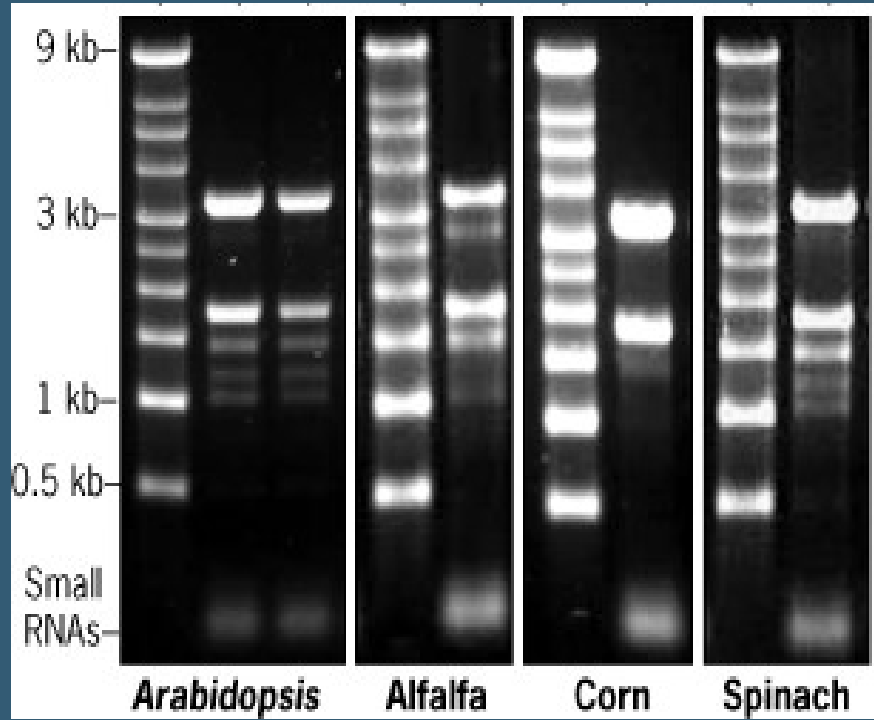
Kontrola degradace: DNA



← •genomická
•DNA

} •DNA
•(degradovaná)

Kontrola degradace: RNA



•25S
•18S

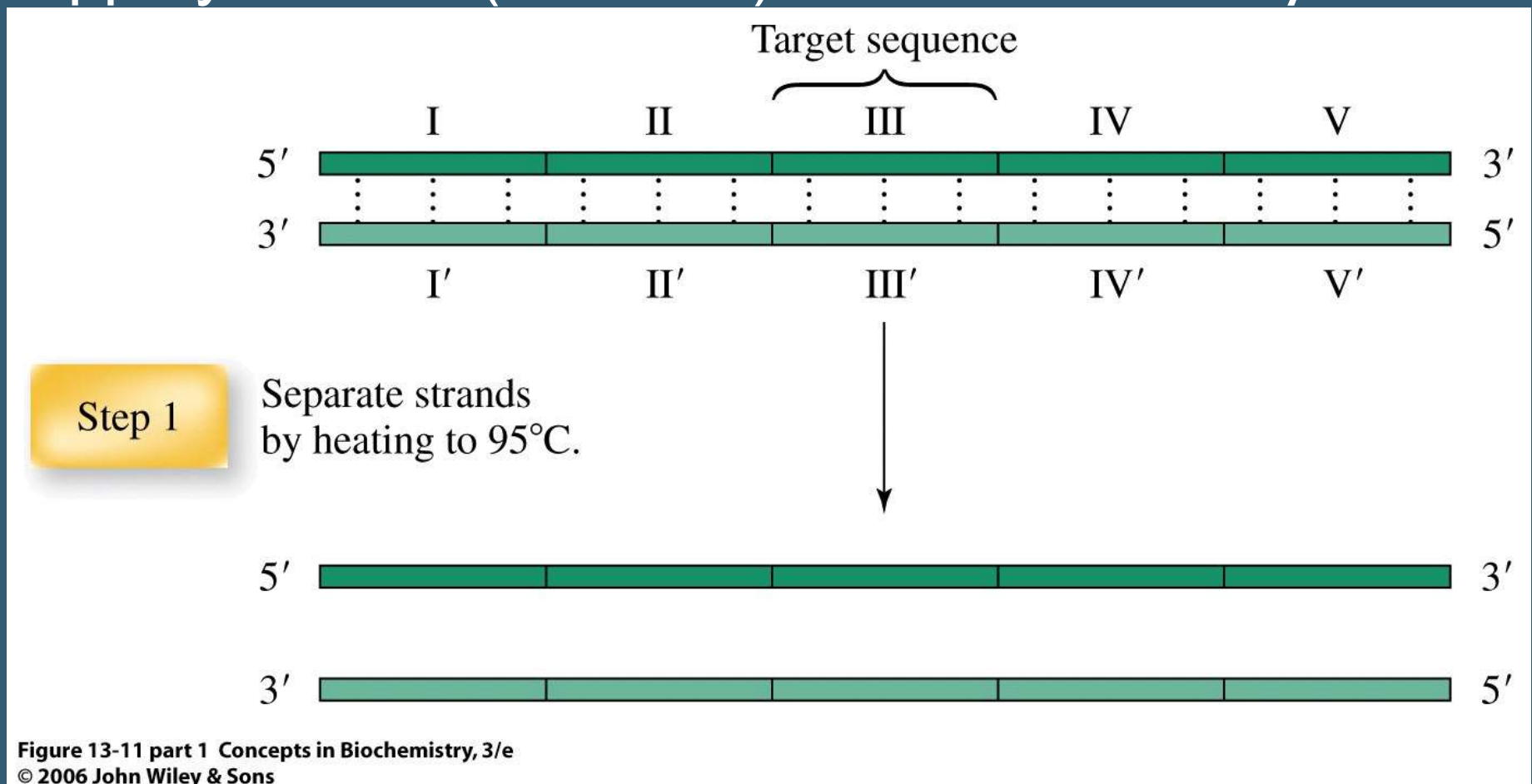
ANALÝZA NUKLEOVÝCH KYSELIN

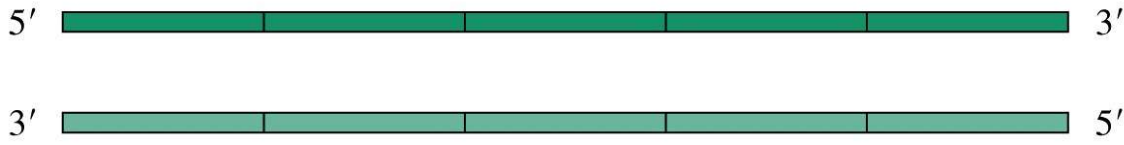
PCR

MULLIS 1983

NC 1993

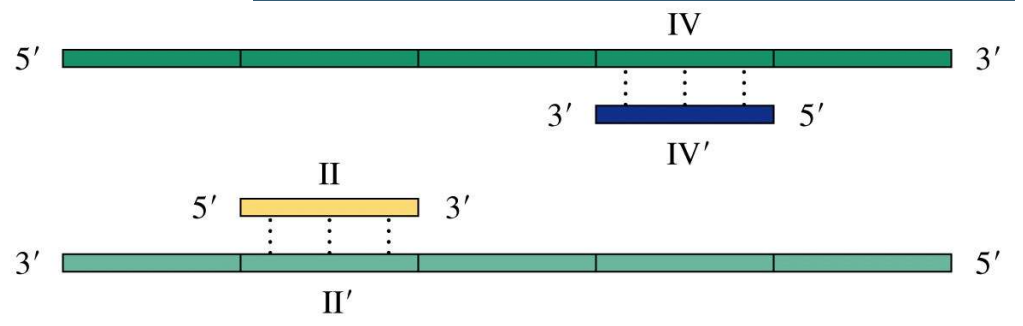
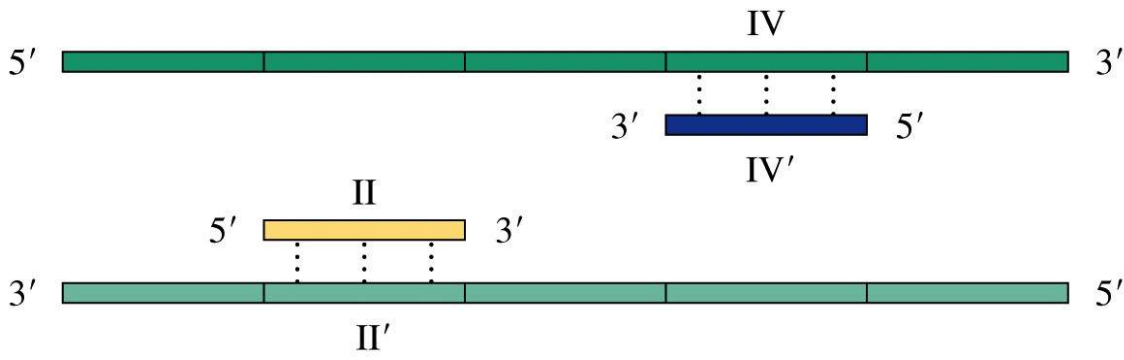
Templátová DNA, primery, NTP,
Taq polymeráza (75-80°C) thermocycler





Step 2

Hybridize primers by cooling to 50°C.



Step 3

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

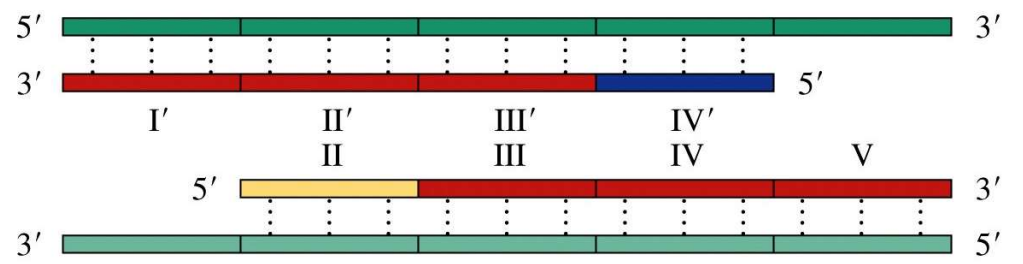
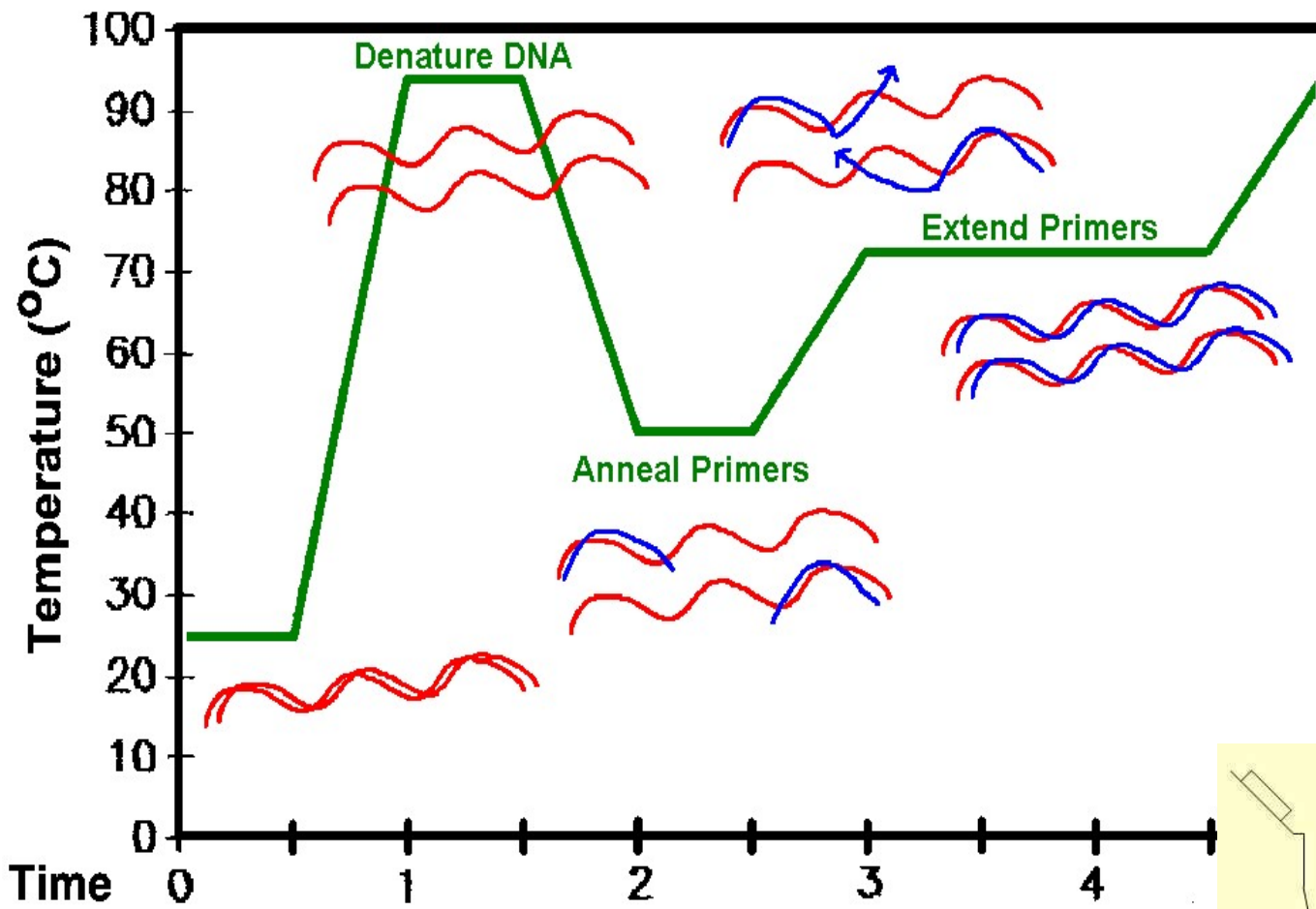
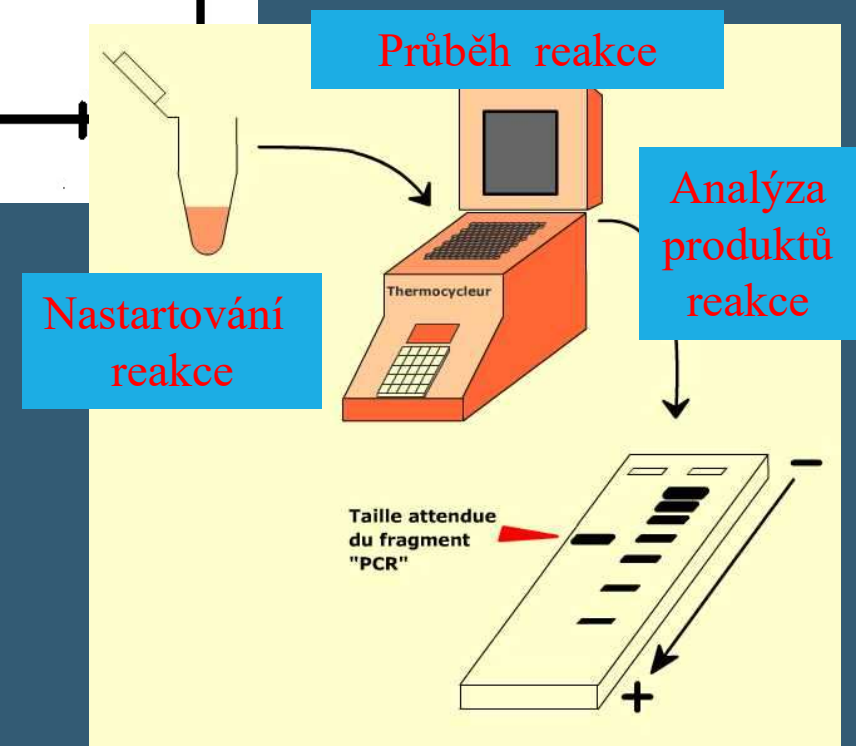


Figure 13-11 part 2 Concepts in Biochemistry, 3/e © 2006 John Wiley & Sons

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



Metodika umožňující mnohonásobné zmnožení (amplifikaci) specifického úseku DNA in vitro založená na principu replikace



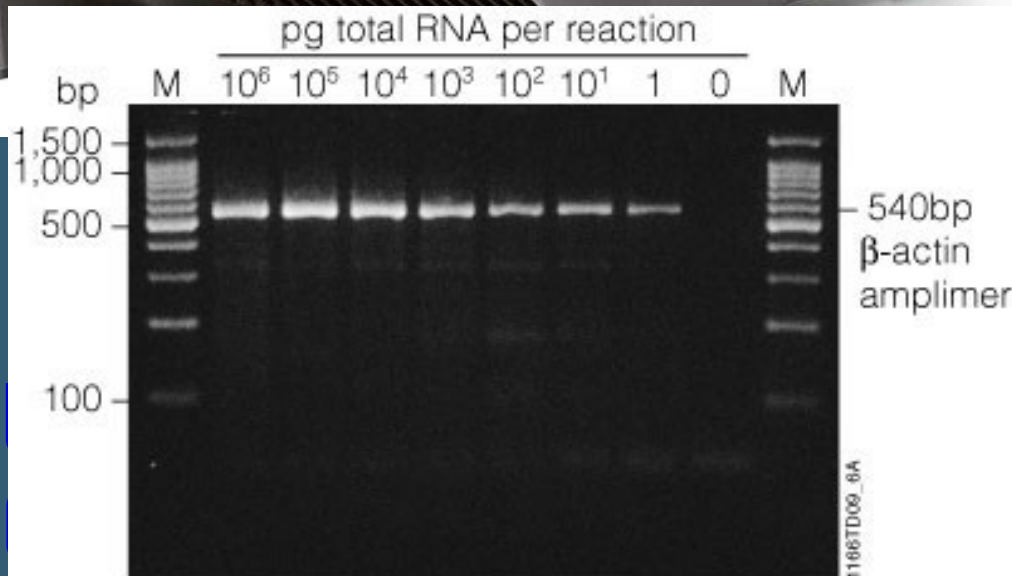
THERMOCYCLER



Replikace DNA in vitro vyžaduje pouze jeden enzym!

Reakční směs obsahuje:

- 1) vodu
- 2) nukleotidy (dNTP)
- 3) reakční pufr
- 4) primery
- 5) termostabilní DNA polymerázu
- 6) templátovou nukleovou kyselinu (DNA)
- 7) případné přídatné látky



REAL TIME PCR

- slouží pro kvantifikaci DNA a transkripce.
- založena na klasické PCR, kontinuální záznam množství DNA v průběhu každého cyklu.
- kvantifikace umožněna přítomností fluorescenčního substrátu, který se váže na přítomnou DNA.
- hladina fluorescence substrátu navázaného na DNA je detekovaná detektorem a odráží množství přítomné DNA, tj. i množství výchozího templátu.
- real-time PCR se obvykle provádí v 96-ti jamkových destičkách.
- Pro detekci cílové DNA je real-time PCR je vysoce citlivou metodou a pokud jsou využity *specifické* fluorescenční substráty, tak je to i metoda vysoce specifická.

REAL TIME PCR

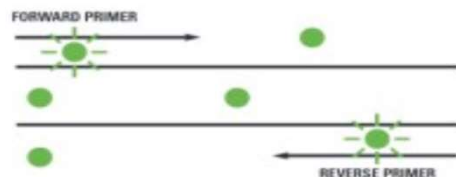
1. **Navázání:** SYBR® Green I se váže během každého cyklu na dvouvláknovou DNA.



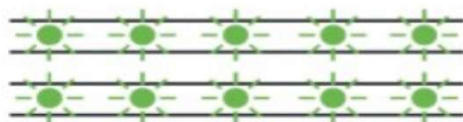
2. **Denaturace:** Ve fázi denaturace DNA je SYBR® Green I uvolněn z vazby na DNA a celková fluorescence dramaticky klesá.



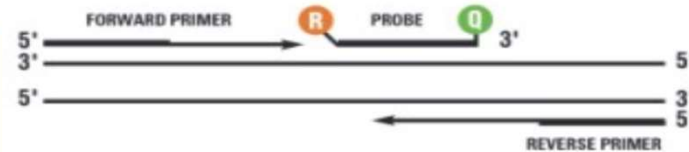
3. **Polymerizace:** Během annealingu primerů a elongace řetězce se Sybr Green opět začíná navazovat na vznikající dvouvláknovou DNA - fluorescence stoupá.



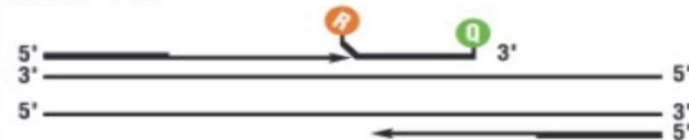
4. **Ukončení polymerizace:** Emitovaná fluorescence dosahuje maxima.



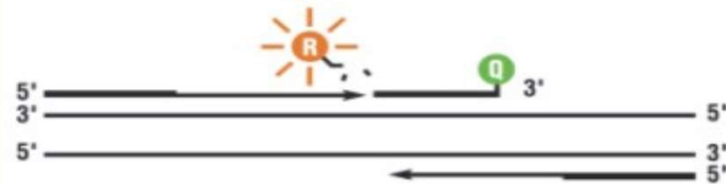
1. **Polymerizace:** Fluorescenční substrát (reporter - R) a jeho zhášecí (Q) jsou navázány na 5' a 3' konce TaqMan sondy.



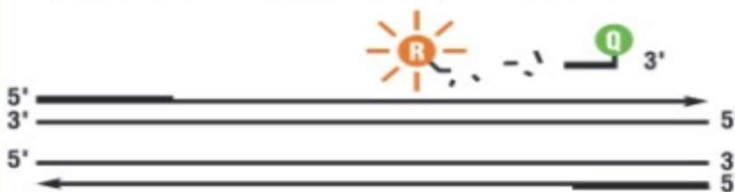
2. **Elongace řetězce:** Dokud je sonda intaktní záření emitované substrátem R je pohlcováno blízkým "zhášecem".



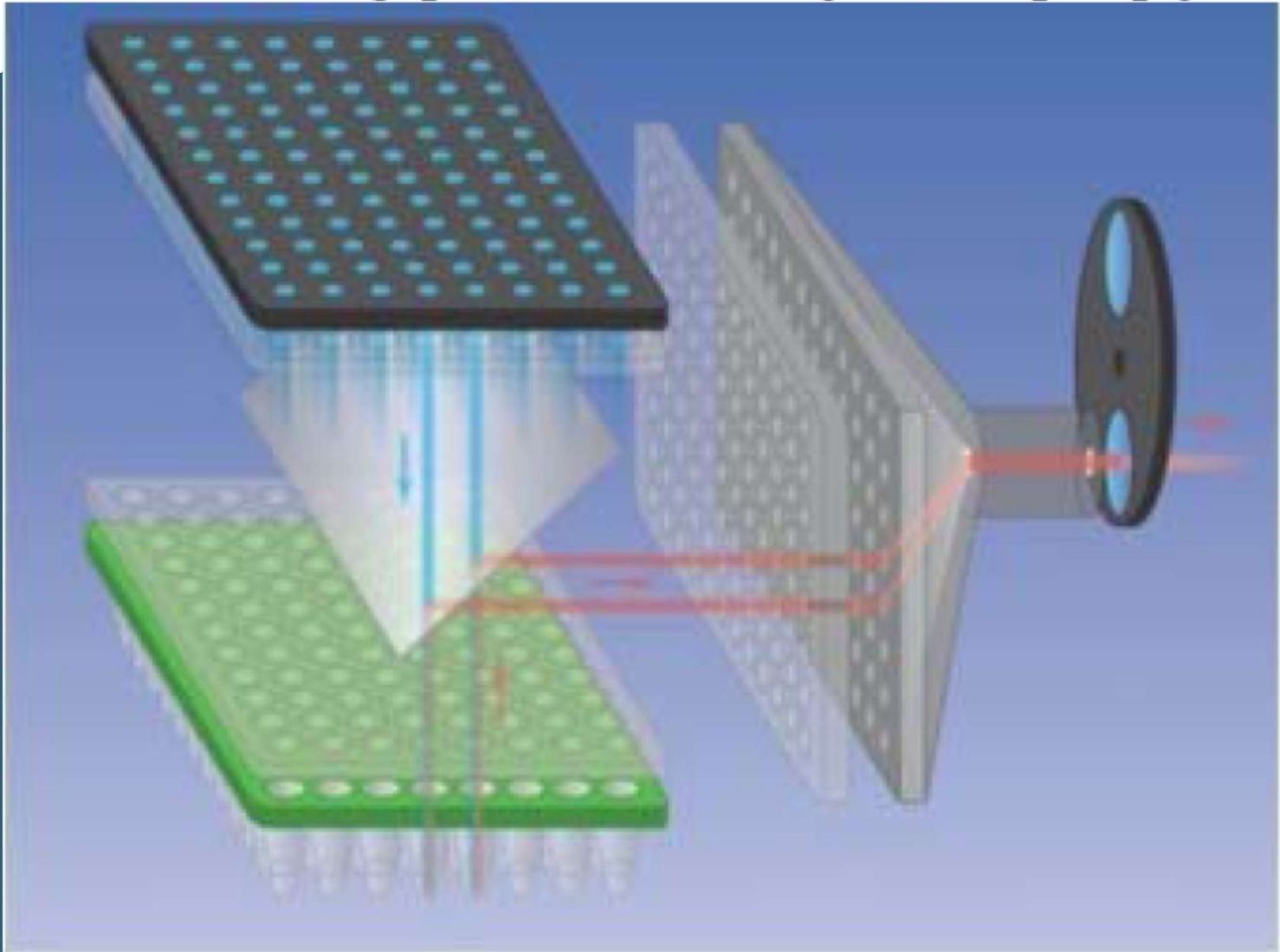
3. **Odštěpení:** když Tag polymeráza dorazí k začátku sondy, postupně ji odchlipuje až odštěpí fluorofor. Ten se tímto oddálí od zhášecí a emitované světlo přestane být pohlcováno - detekovaná fluorescence stoupá.



4. **Polymerizace ukončena:** reporterová barva oddělená od zhášecí emituje charakteristickou fluorescence.

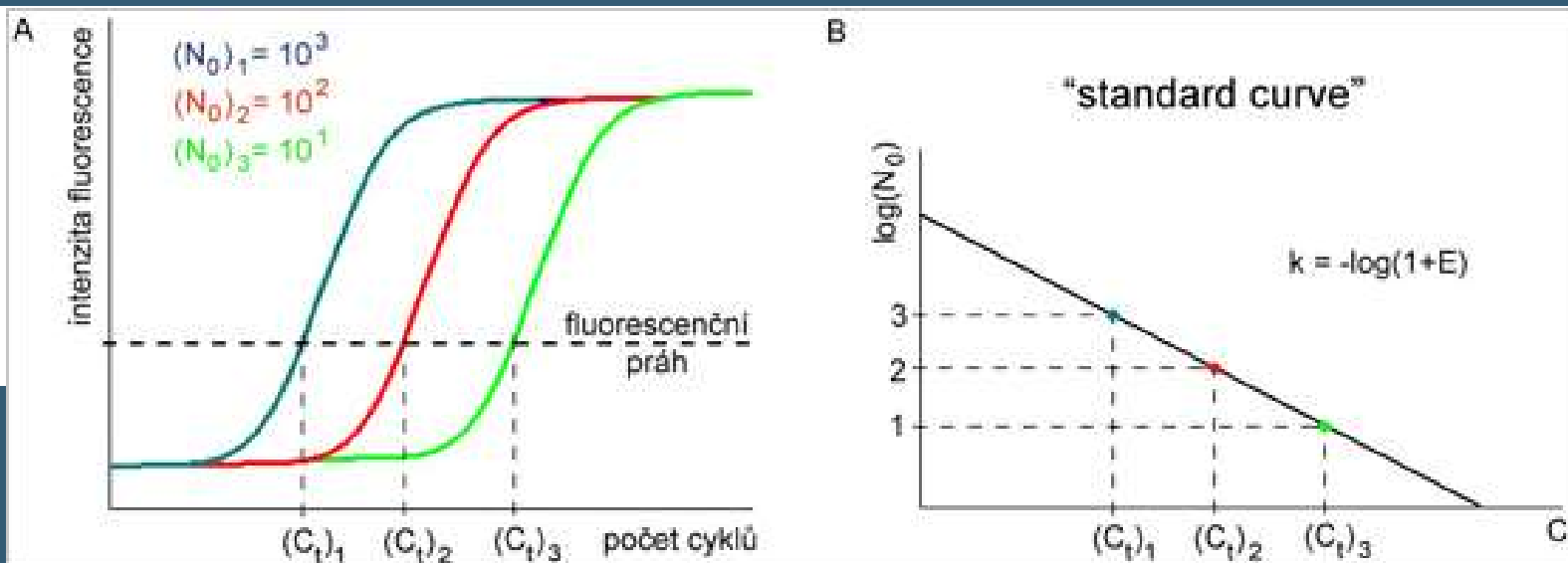


REAL TIME PCR



REAL TIME PCR





Real-time PCR je založena **na konceptu Ct hodnoty** (Ct jako cycle of treshold, cyklus prahu). Ct hodnota reflektuje cyklus, kdy dochází k nárůstu fluorescence nad práh pozadí, které se v reakci vyskytuje. Tato fluorescence je zachycena detektorem. **Číslo tohoto cyklu je zaznamenáno a dále využíváno právě jako Ct hodnota.** Přitom je důležité si uvědomovat, že **čím je Ct nižší, tím více bylo do reakce dodáno templátové DNA,** a naopak.

Pokud budeme uvažovat, že účinnost PCR reakce je ideálních 100%, lze rozdíl v koncentraci templátové DNA nanesené do reakce u srovnávaných vzorků, vyhodnotit jako rozdíl v Ct hodnotách. Tj. jako $2 \Delta C_t$, kde ΔC_t je rozdíl v Ct hodnotách mezi srovnávanými vzorky.

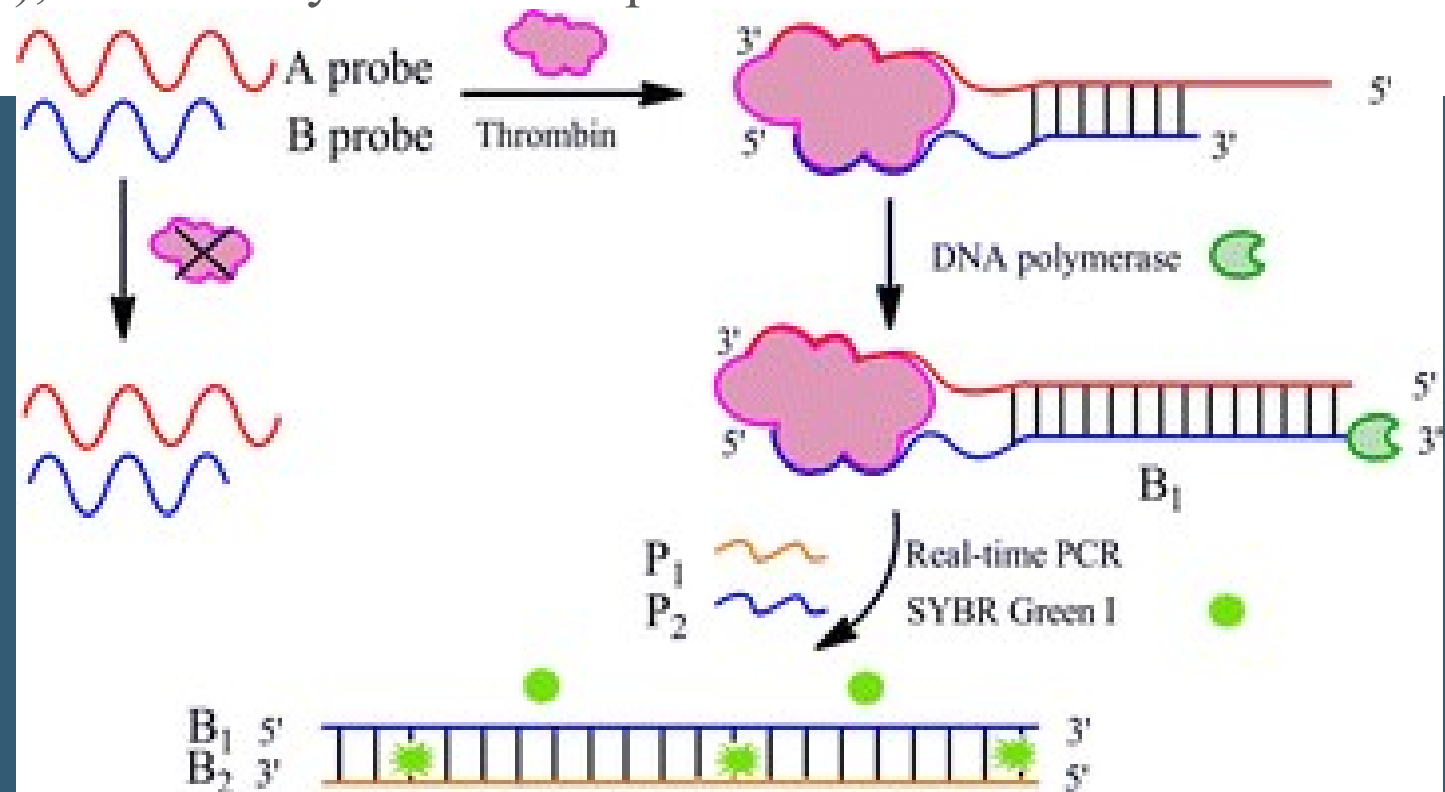
REAL-TIME PCR

Oblasti využití

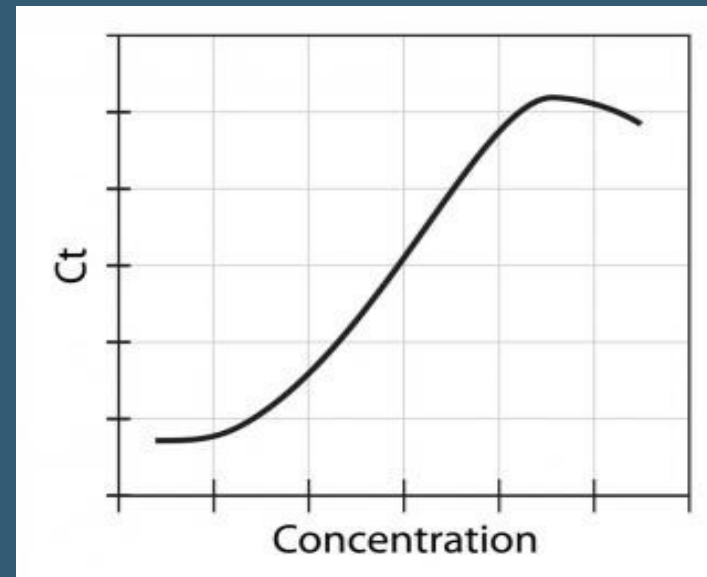
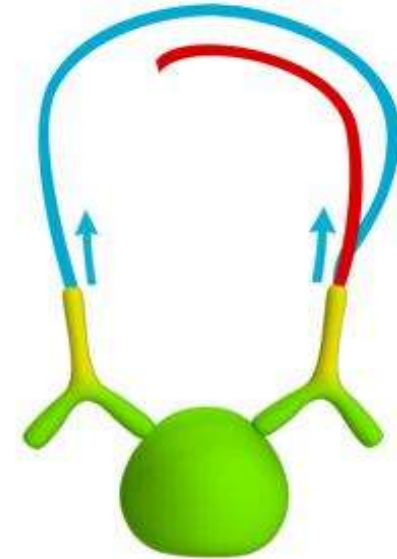
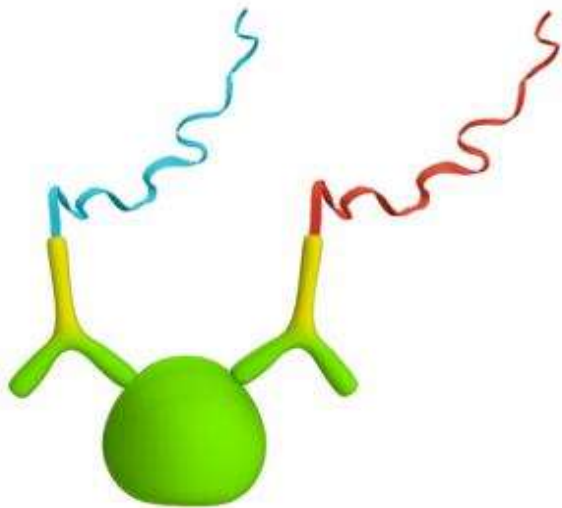
- Analýza genové exprese
- Detekce geneticky modifikovaných organismů
- Detekce a kvantifikace patogenů

REAL-TIME PCR PROTEINŮ

- **Advantage** of the ability to precisely control and rapidly change the temperature of a large number of small volume samples while monitoring sample fluorescence.
- Available excitation and emission wavelengths correspond to those of the dyes commonly used as reporters for nucleic acids.
- intrinsic fluorescence of tyrosine and tryptophan residues cannot be detected – utilization of green fluorescent protein (GFP), the addition of a reporter dye (SYPRO orange), or naturally fluorescent proteins



REAL TIME PCR PROTEINŮ



STANOVENÍ SEKVENCE DNA

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

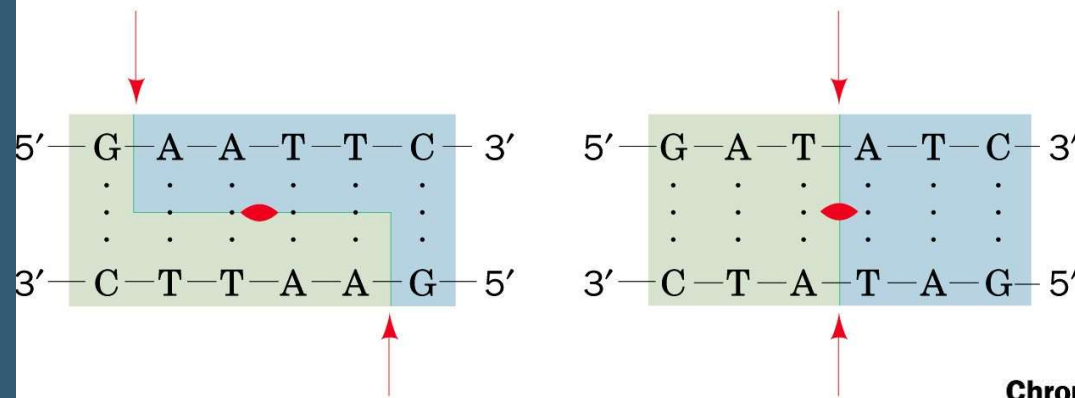
RESTRIKČNÍ ENZYMY

Enzyme	Recognition Sequence ^a	Microorganism
<i>AclI</i>	AG↓C ^a T	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>BamHI</i>	G↓GATC ^a 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 ^a TTC	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>EcoRII</i>	↓CC ^a (G)GG	<i>Escherichia coli</i> R245
<i>EcoRV</i>	GA ^a T↓ATC	<i>Escherichia coli</i> 162 pLG74
<i>HaeII</i>	RGCCG↓Y	<i>Haemophilus argyritus</i>
<i>HaeIII</i>	GG↓C ^a C	<i>Haemophilus argyritus</i>
<i>HindIII</i>	A ^a ↓AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> R ₄
<i>HpaII</i>	C↓A ^a GG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>MspI</i>	C ^a ↓CCG	<i>Moraxella</i> species
<i>PvuI</i>	CTGCA ^a ↓G	<i>Providencia stuartii</i> 164
<i>PvuII</i>	CAG↓C ^a TG	<i>Protona vulgaris</i>
<i>SalI</i>	G↓TCGAC ^a	<i>Streptomyces albus</i> G
<i>TaqI</i>	T↓CGA ^a	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>XbaI</i>	C↓TCGAG	<i>Xanthomonas Axlopii</i>

RESTRIKČNÍ ENZYMY

(a) *EcoRI*

(b) *EcoRV*



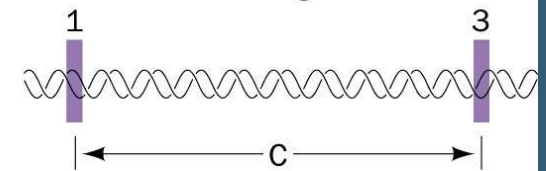
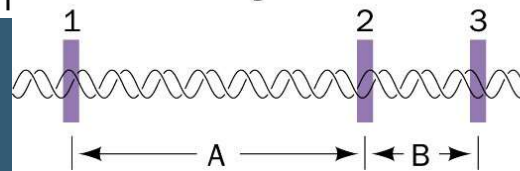
↓ Cleavage site ● Twofold sym

Chromosome I

Chromosome II

DNA has 3 target sites

DNA has only 2 of the target sites

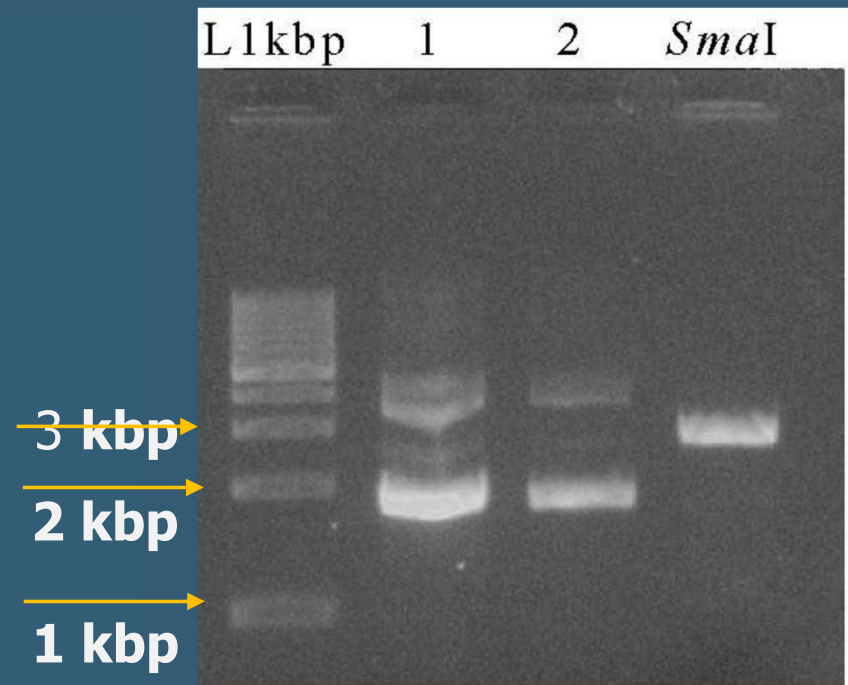
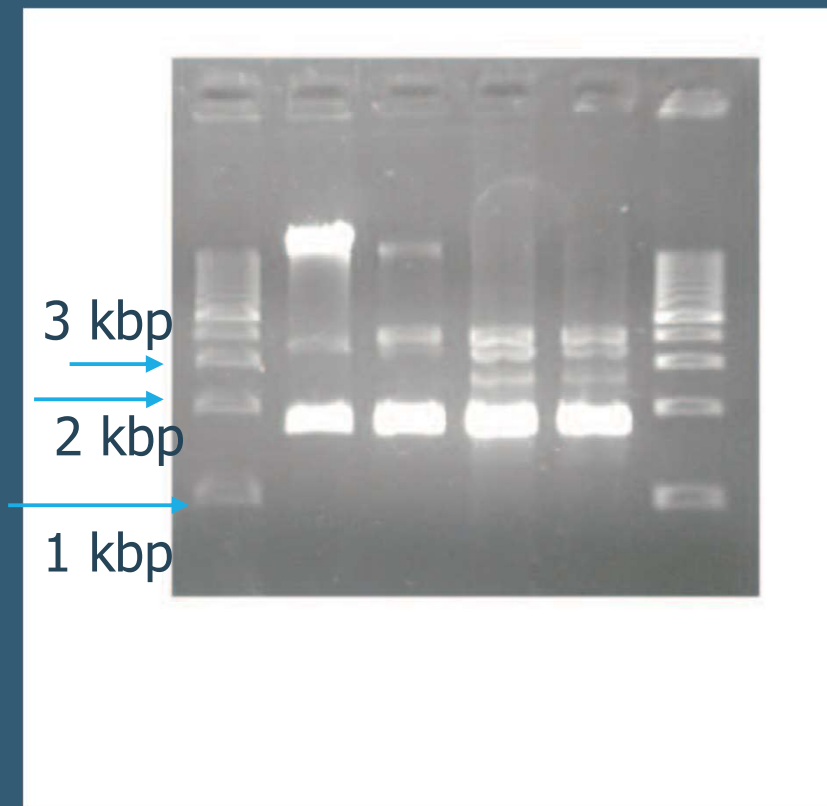


Cleave with restriction enzyme and electrophoresis

Fragment C is the size of A + B combined



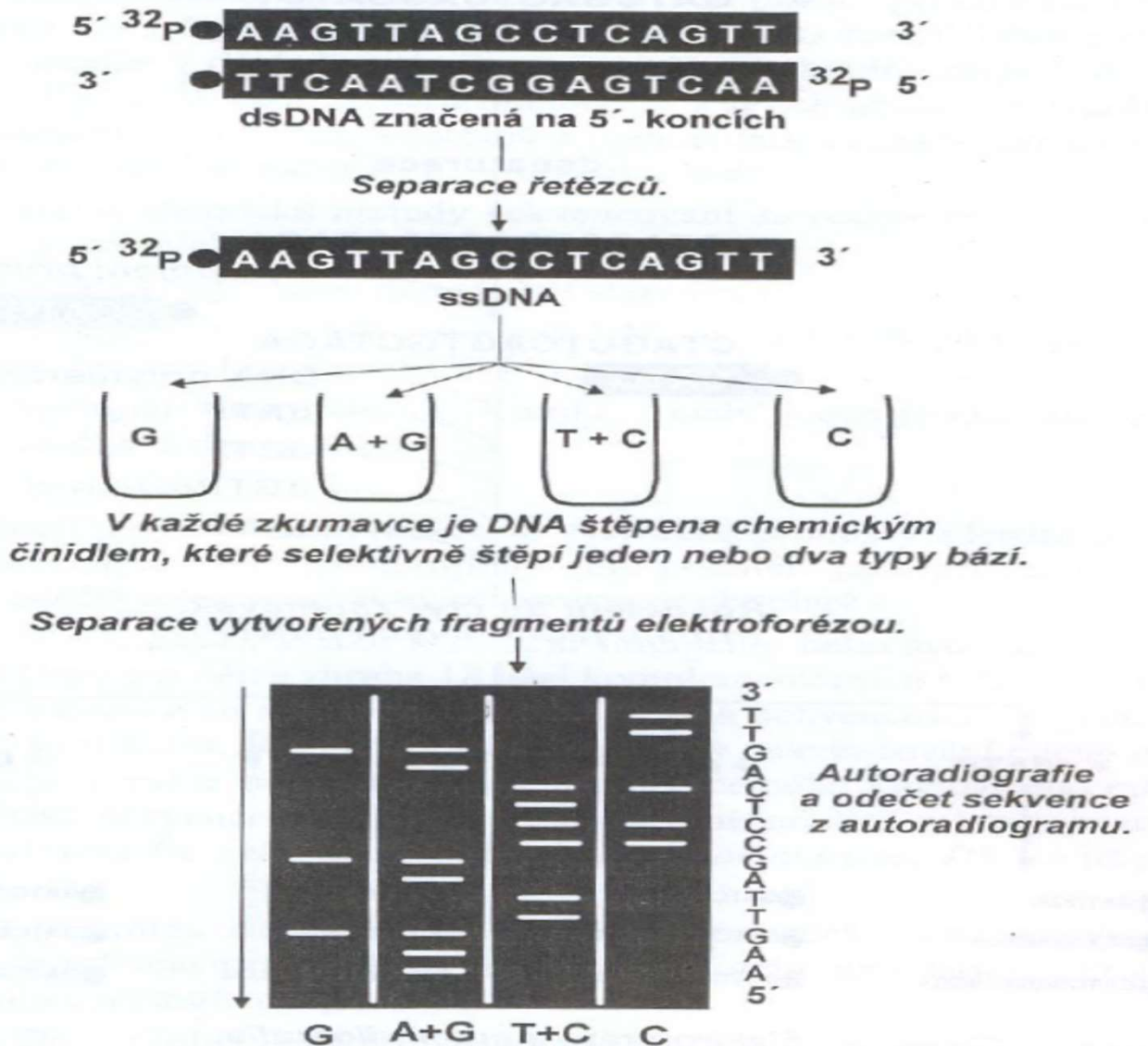
RESTRIKČNÍ ENZYMY



MAXAM GILBERTOVA METODA

Maxam-Gilbertova metoda

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



MAXAM GILBERTOVA METODA



radioaktivní značení na 5' konci DNA
(typicky pomocí kinázy s použitím gama- ^{32}P ATP) a purifikace fragmentu DNA,
který se má sekvenovat .

2) Chemické působení vytváří zlomy v malé frakci u jedné nebo dvou bází ze 4,
v každé se 4 reakcí: (G, A+G, C, C+T).

puriny (A+G) se depurinují s použitím kyseliny mravenčí,

guaniny (G) (a částečně i adeniny) se methylují dimethylsulfátem

pyrimidiny (C+T) – báze se odštěpují hydrazinem.

Přídavek soli (NaCl) k hydrazinu inhibuje methylaci thyminu, reakce je pak
specifická pro C.

3) Modifikované DNA jsou pak štěpeny v horkém piperidinu v pozici
modifikované báze. Tím se vytváří soubor značených fragmentů od značeného
konce až po první štěpení v každé molekule.

4) Fragmenty z jednotlivých reakcí jsou naneseny na elfo vedle sebe v
denaturujícím PAGE pro separaci podle velikosti. Vizualizace pomocí

autoradiografie (rtg film)

dimethylsulfát a piperidin

hydrazin a piperidin

ENZYMOVÁ METODA

Sangerovo sekvenování (Chain-termination seq., dideoxy-seq.)

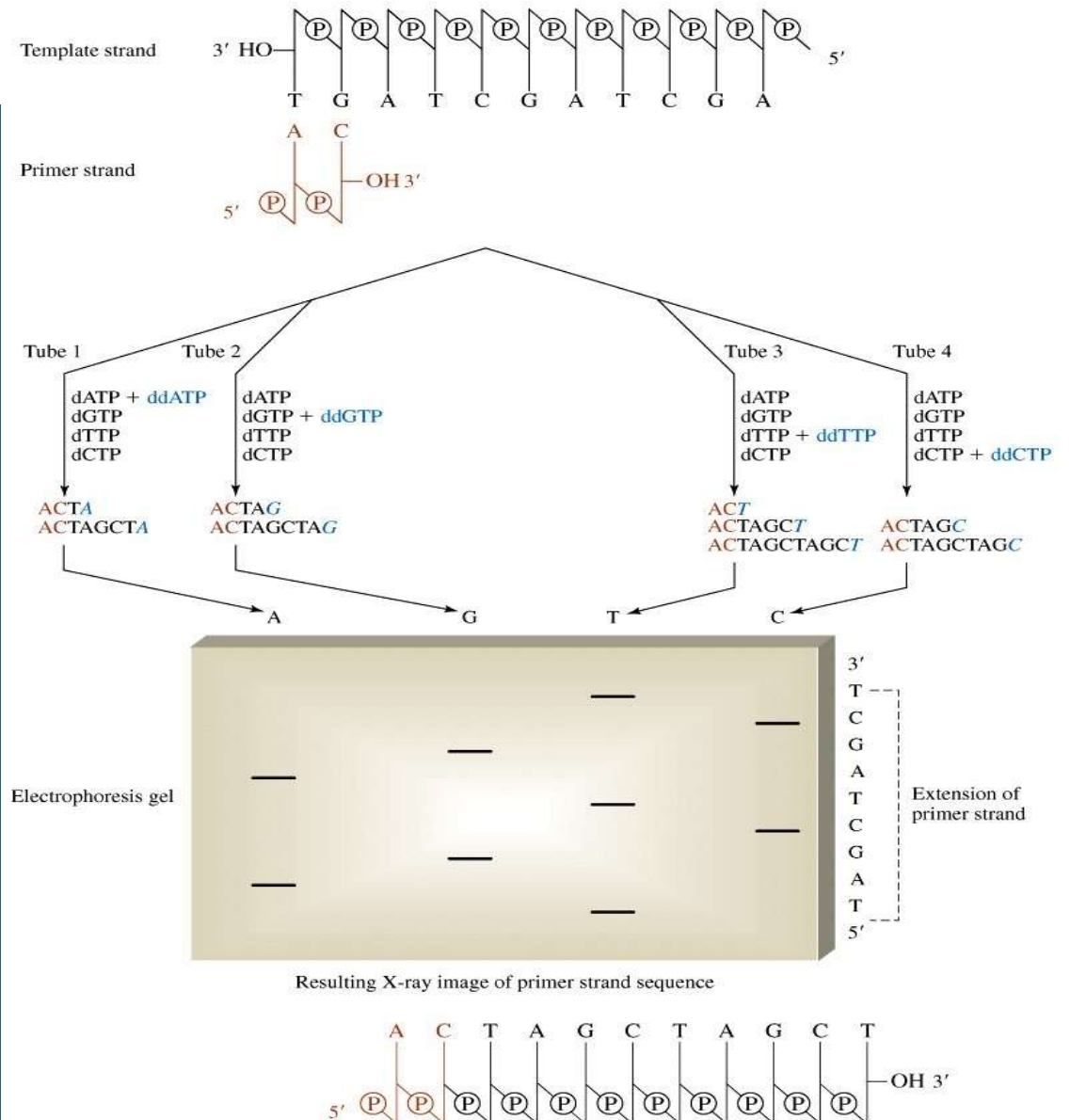
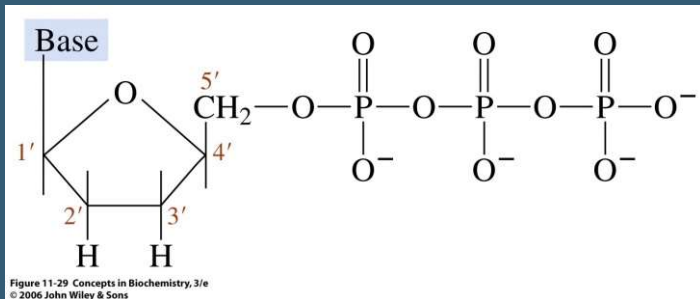
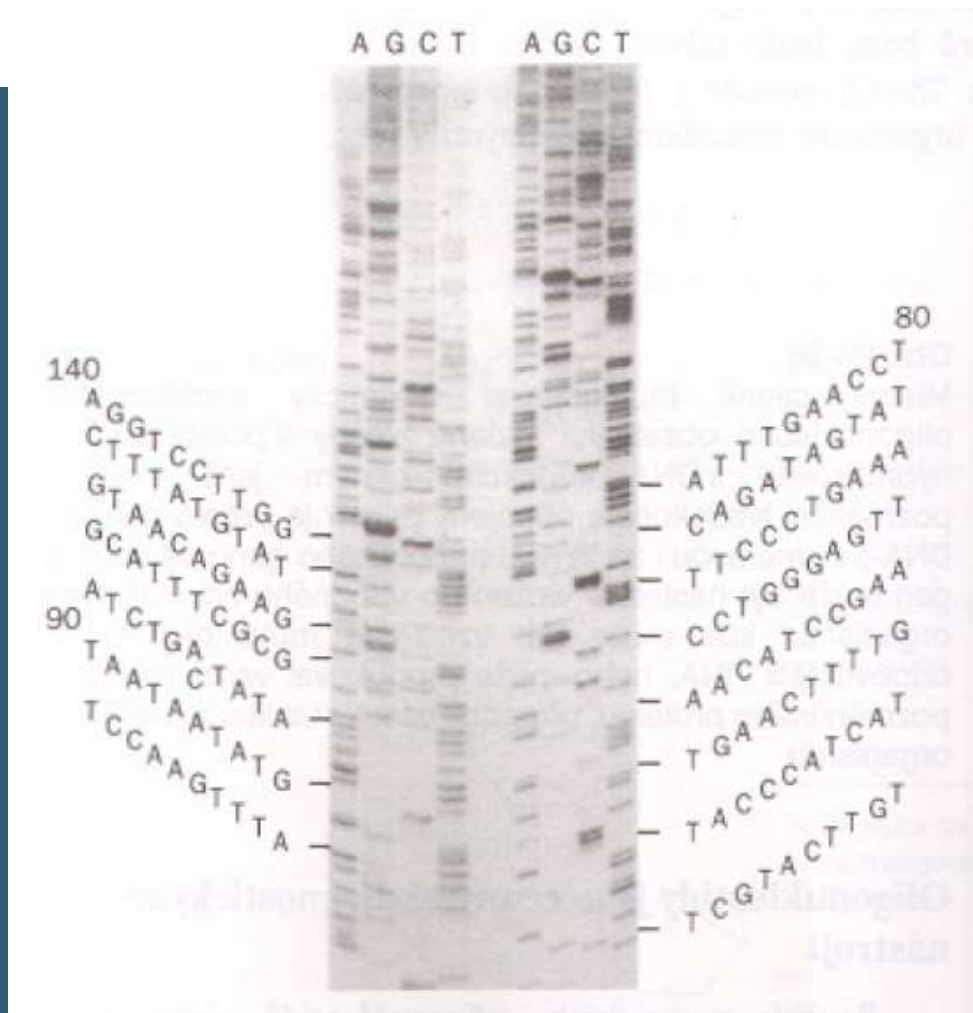
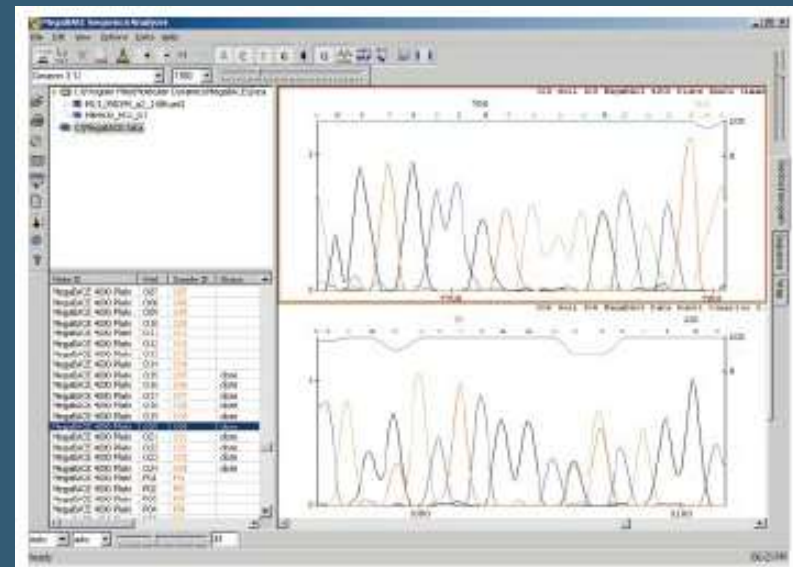
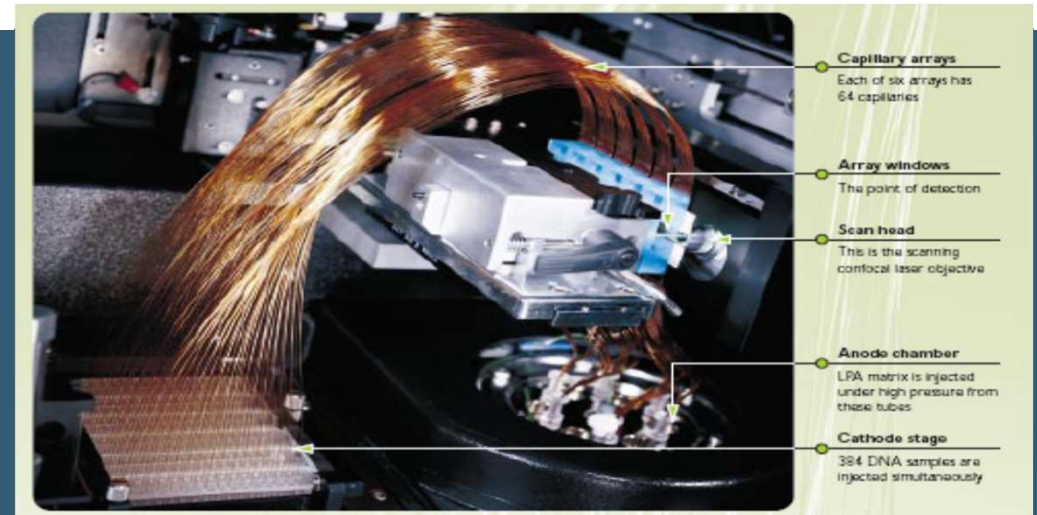


Figure 11-30 Concepts in Biochemistry, 3/e
© 2006 John Wiley & Sons



2003 - PROJEKT LIDSKÉHO GENOMU





SCIENCE LIBRARY

PYROSEKVENOVÁNÍ

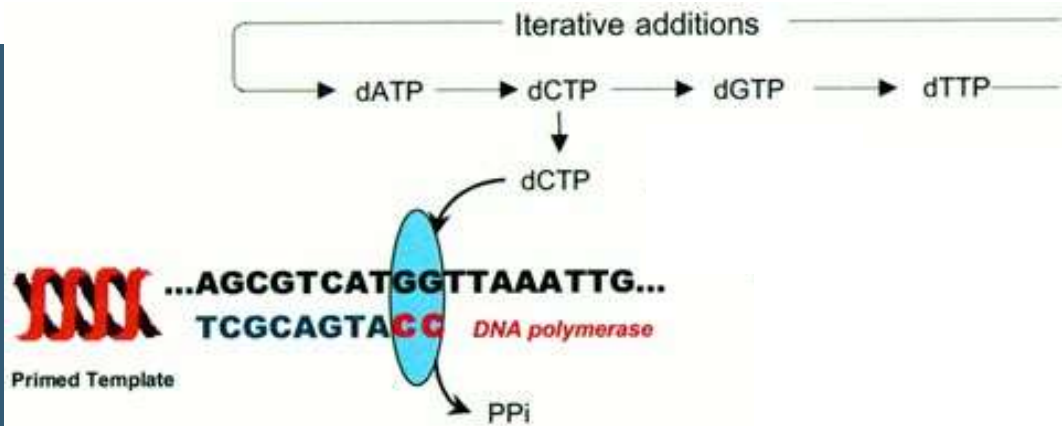
- První reakcí je DNA polymerace pomocí DNA polymerázy, kdy dochází k zařazení příslušného deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) za uvolnění pyrofosfátu.



Pozn.

Nové sekvenační metody tzv. druhé generace (Next Generation Sequencing, NGS) opět využívají syntézu DNA podle templátu, ale na rozdíl od Sangerovy metody jsou schopny **detekovat přidávání bází jednu po druhé** a zároveň sekvenovat tisíce až miliony rozdílných molekul DNA najednou.

PYROSEKVENOVÁNÍ



PYROSEKVENOVÁNÍ

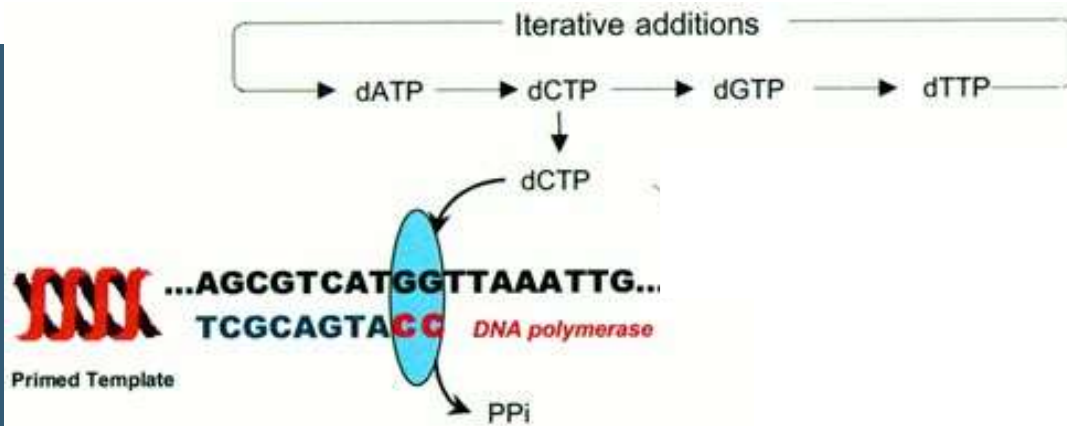
- První reakcí je DNA polymerace pomocí DNA polymerázy, kdy dochází k zařazení příslušného deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) za uvolnění pyrofosfátu.



- 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



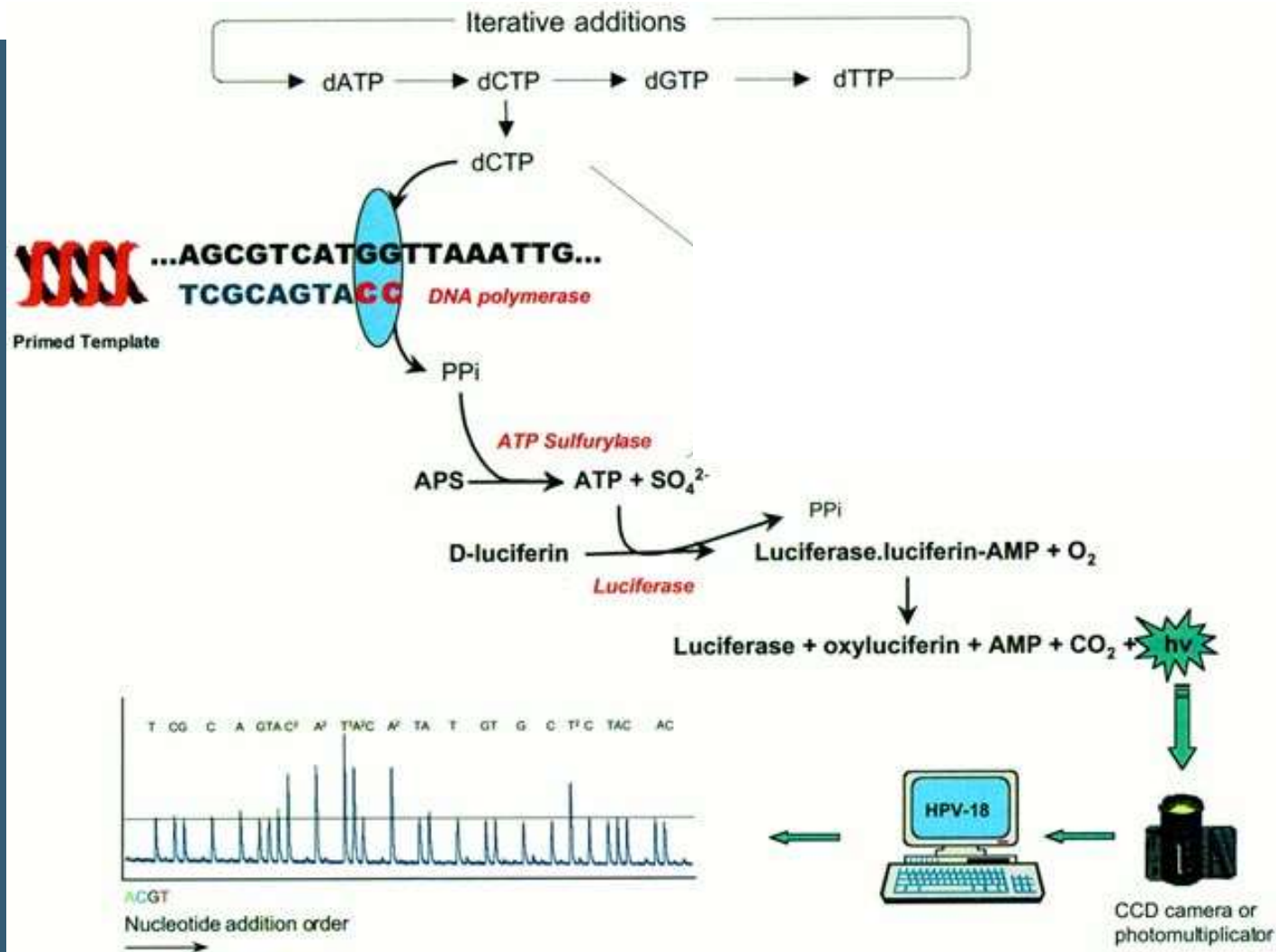
PYROSEKVENOVÁNÍ

- 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

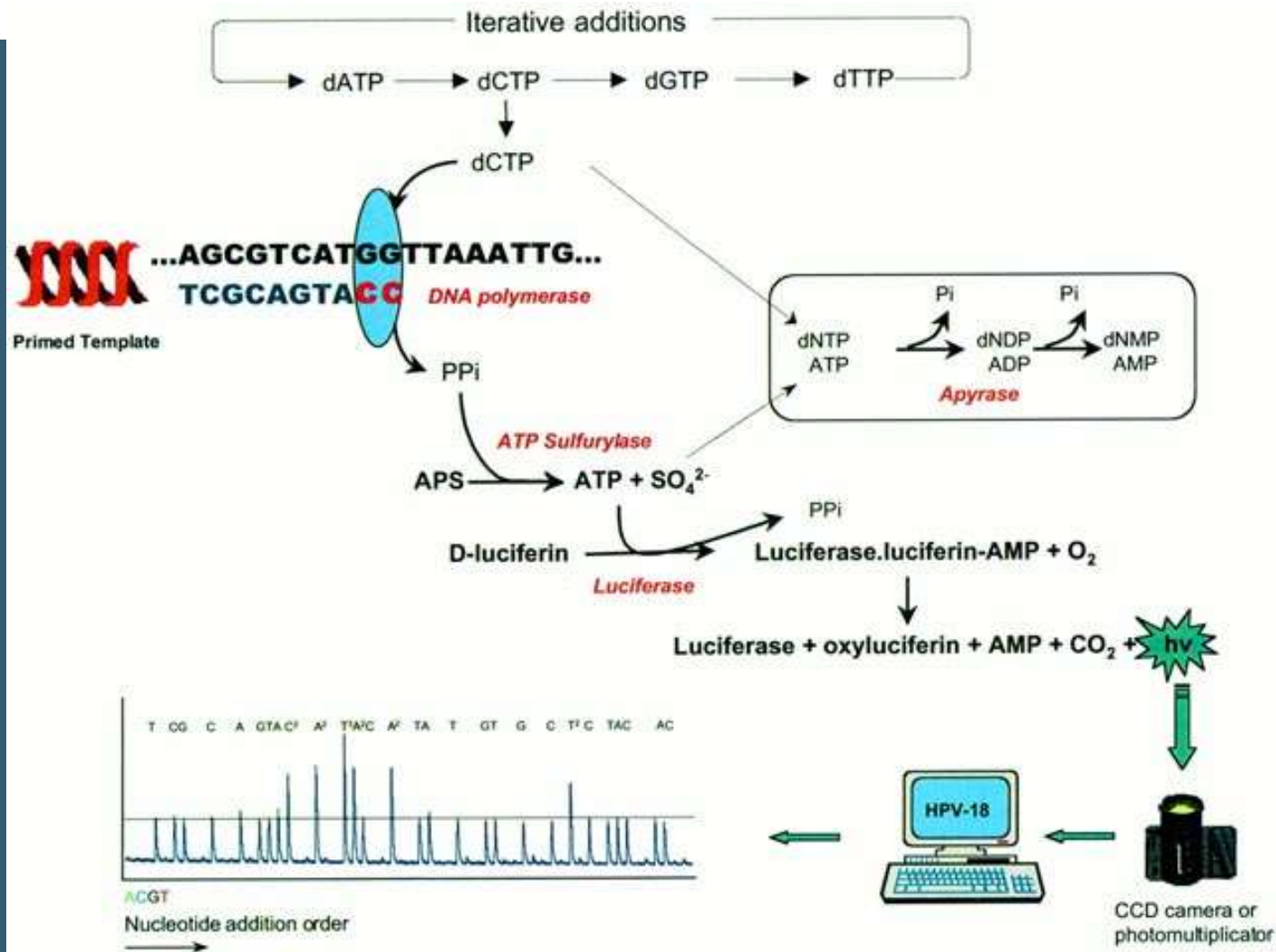


PYROSEKVENOVÁNÍ

- 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.

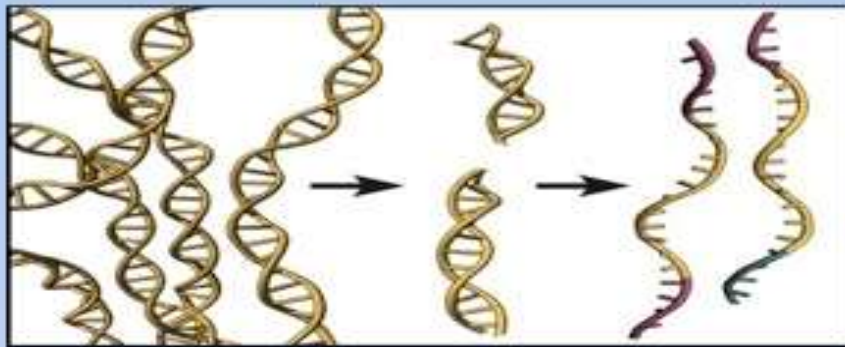


PYROSEKVENOVÁNÍ

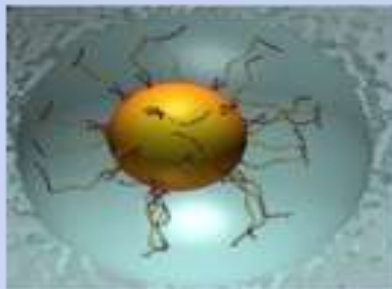


PYROSEKVENOVÁNÍ

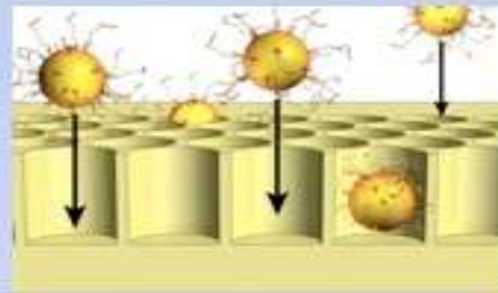
Process Overview



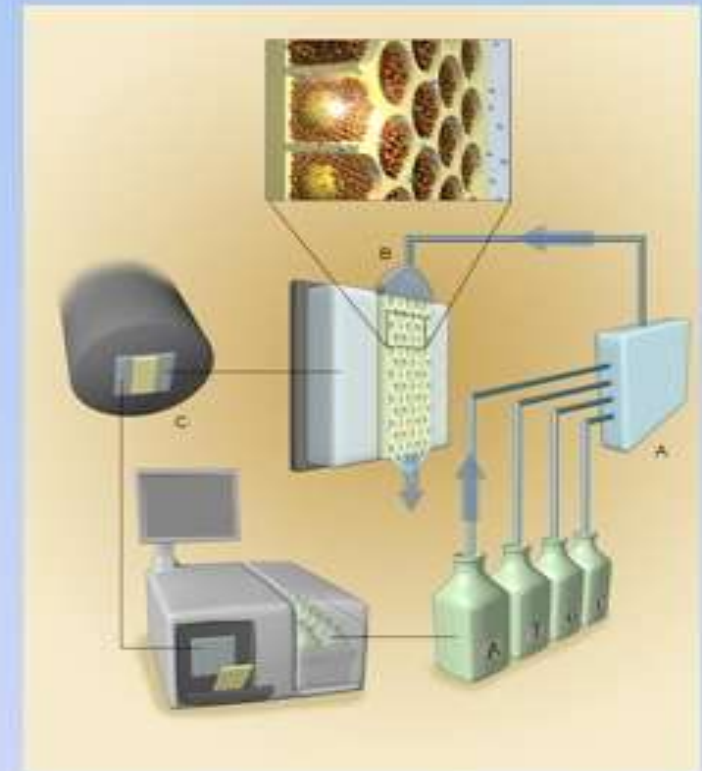
1) Prepare Adapter Ligated ssDNA Library



2) Clonal Amplification on 28 μ m beads



3) Load beads and enzymes in PicoTiterPlate™



4) Perform Sequencing by synthesis on the 454 Instrument

454 PYROSEKVENOVÁNÍ

r.2005

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.)

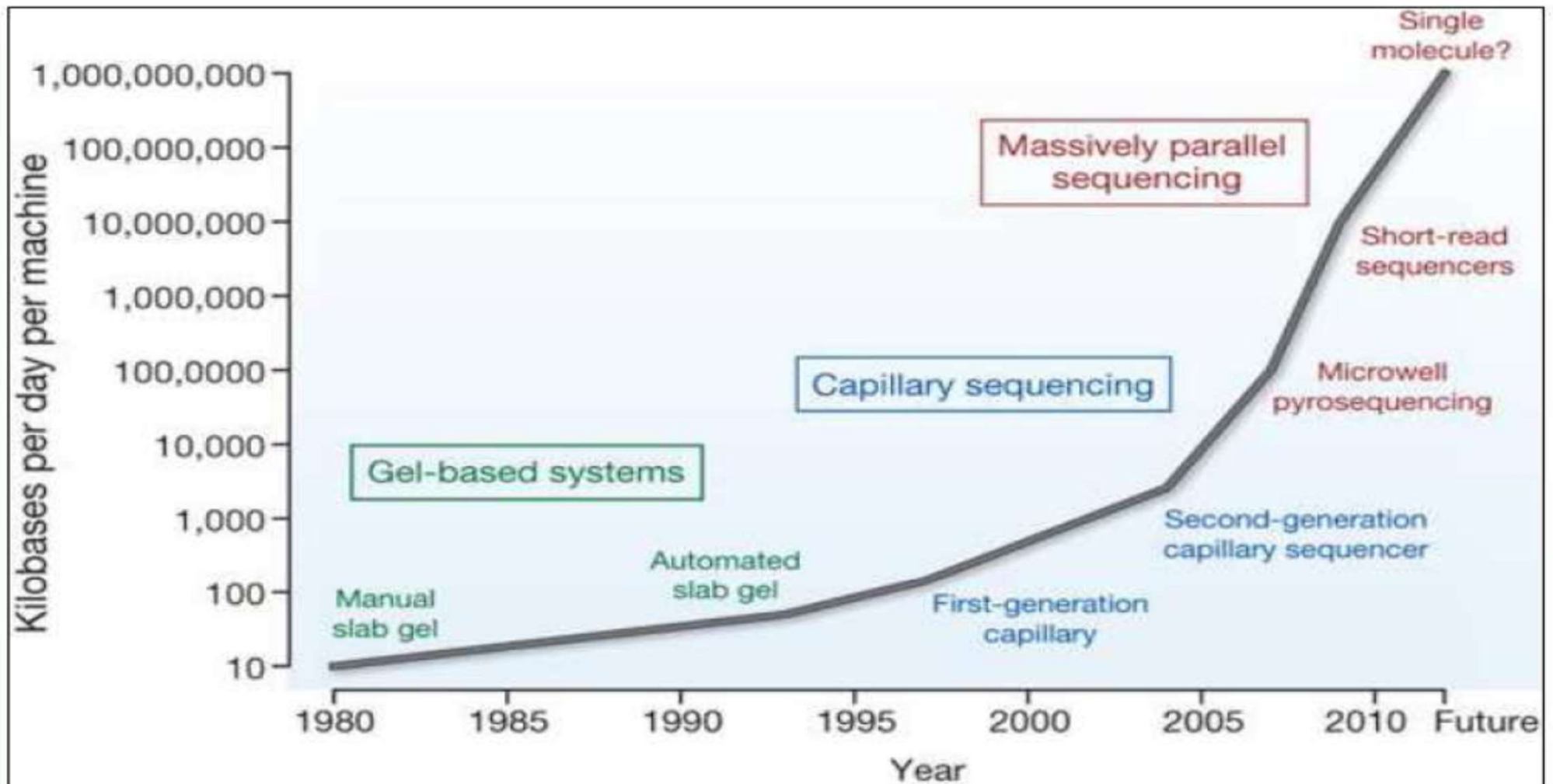
- tzv. ampikonové sekvenování. Vlastní sekvenaci předchází PCR zacílená na 16S nebo 18S geny prokaryot a eukaryot

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

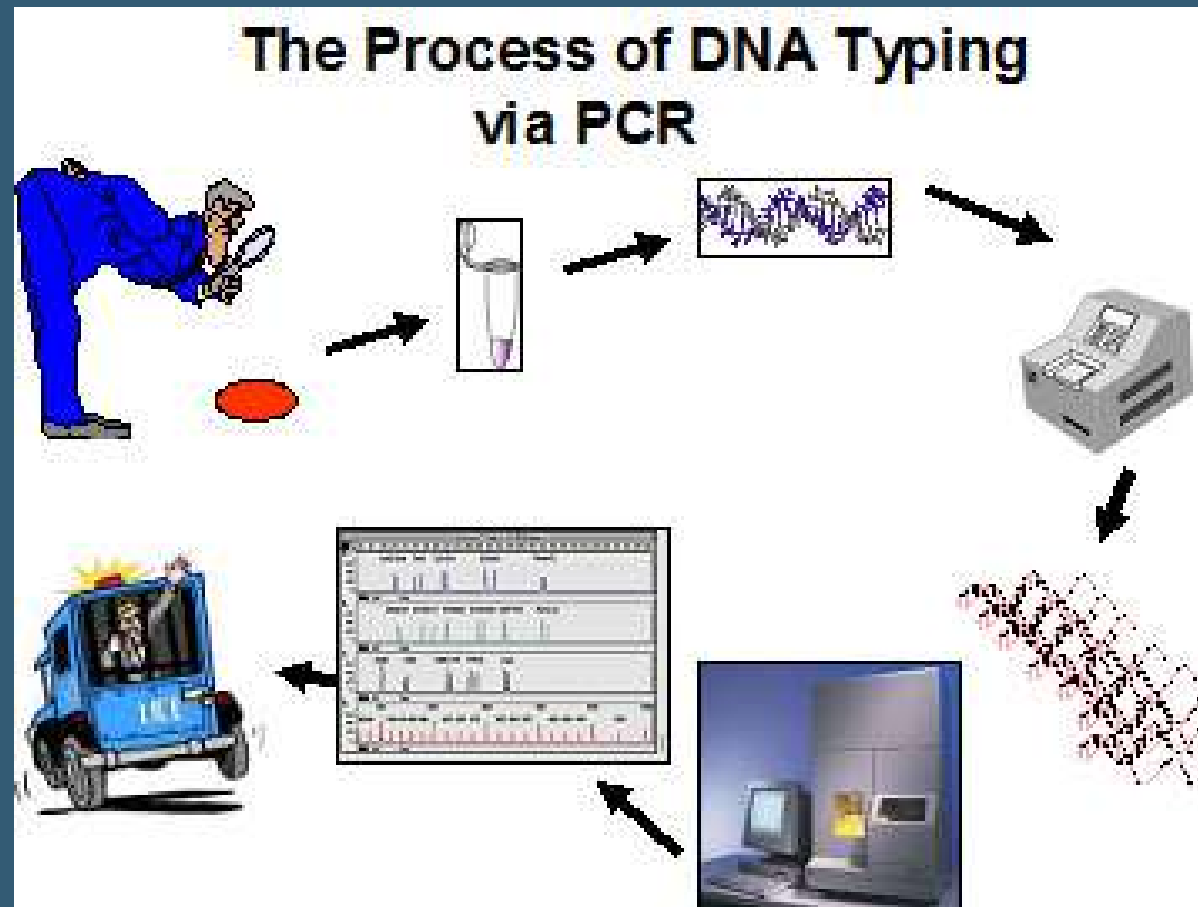


Zařízení je velmi nákladné (cca 17 mil. Kč), analýzy jsou ale dostupné komerčně, takže většina laboratoří v současnosti využívá služeb externích sekvenačních středisek.

SEKVENOVÁNÍ



GENETICKÁ DAKTYLOSKOPIE

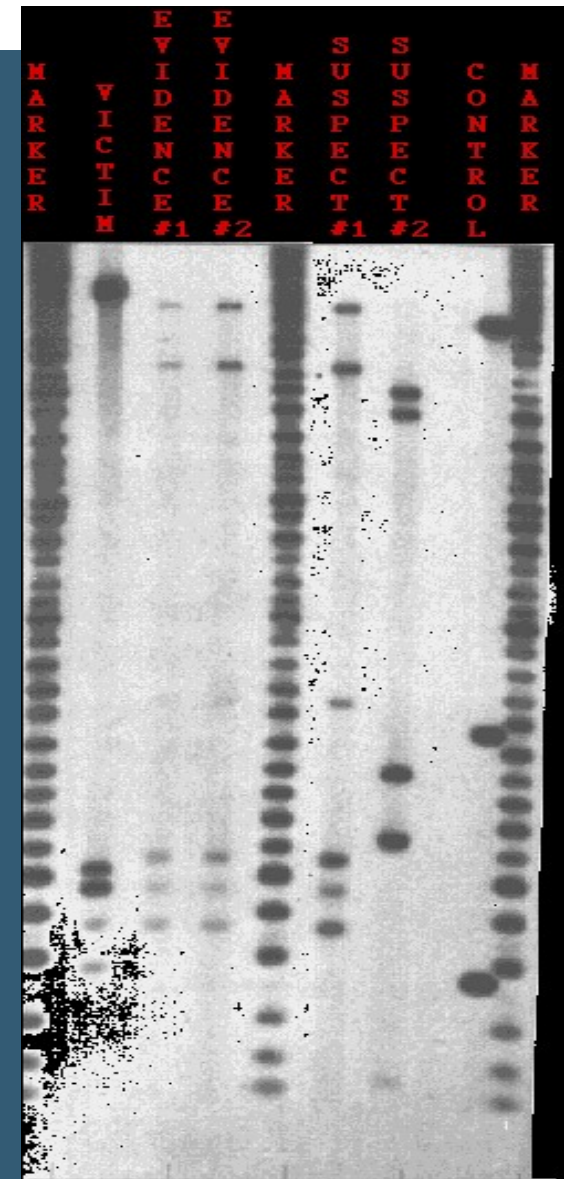


POUŽITÍ RESTRIKČNÍCH ENZYMŮ - RFLP

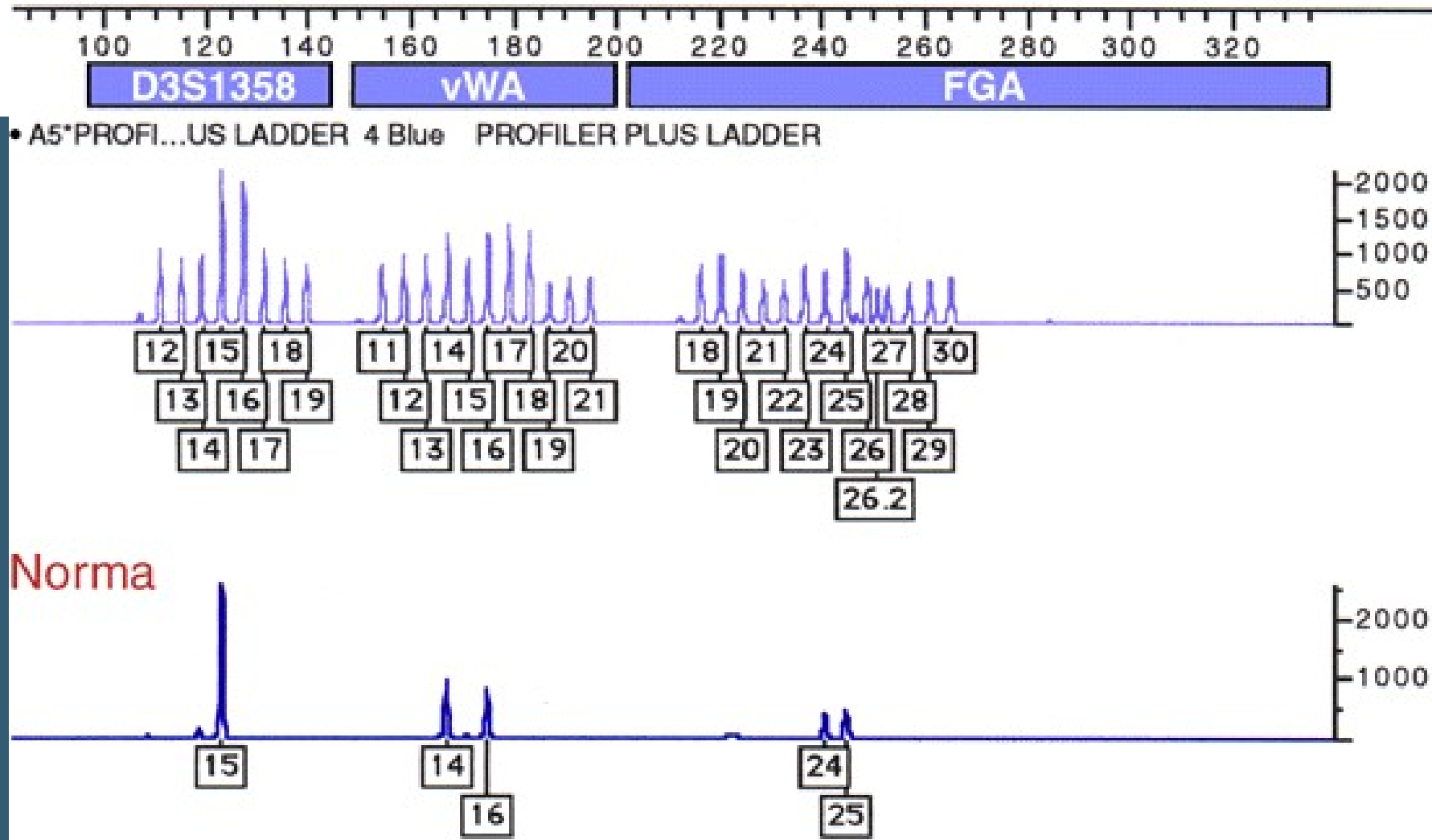
RESTRICTION FRAGMENT LENGTH

POLYMORPHISM

- Geny i nekódující úseky DNA se mohou vyskytovat v různých variantách na párových chromozomech. Jedna varianta se dědí od matky, jedna od otce, proto označení párové chromozomy.
- Rozdíl může být v jednom, nebo více nukleotidových párech.
- Pro existenci této metody byl nezbytný objev restričních enzymů (tzv. endonukleáz), které dokážou rozštěpit DNA na jednotlivé úseky.
- Ty jsou poté elektroforeticky separovány a přeneseny z elektroforetického gelu na nitrocelulózovou či nylonovou membránu.
- Polymorfismus těchto fragmentů je potom detekován za pomoci **hybridizace** a účasti specifických hybridizačních sond.



SHORT TANDEM REPEATS



M U N I
S C I

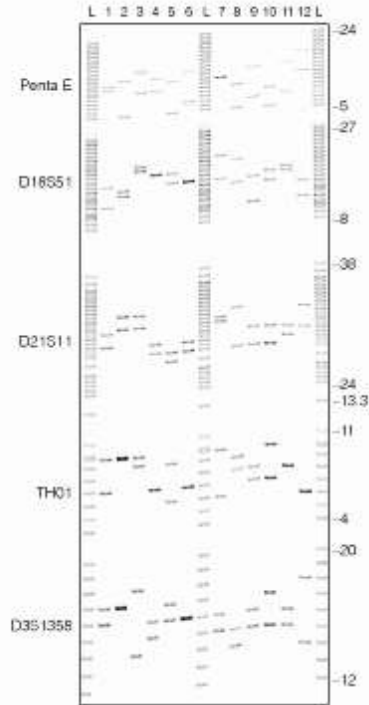
Short tandem repeats (STRs) jsou krátké sekvence DNA, známé jako mikrosatelity, které se tandemově opakují (opakuje se úsek 1-6 bp dlouhý).

SHORT TANDEM REPEATS

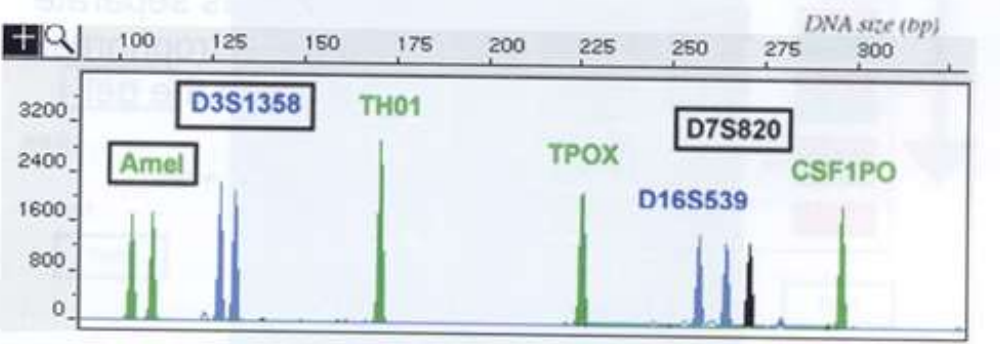
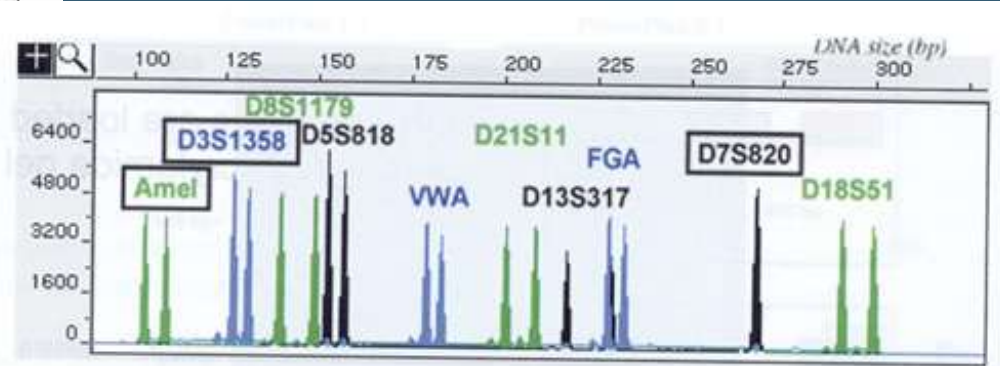
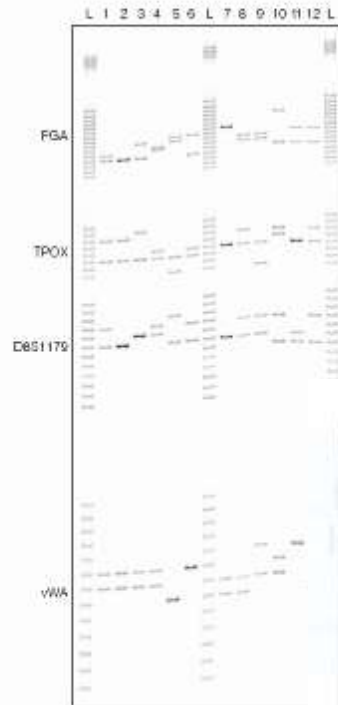
A.



B.



C.

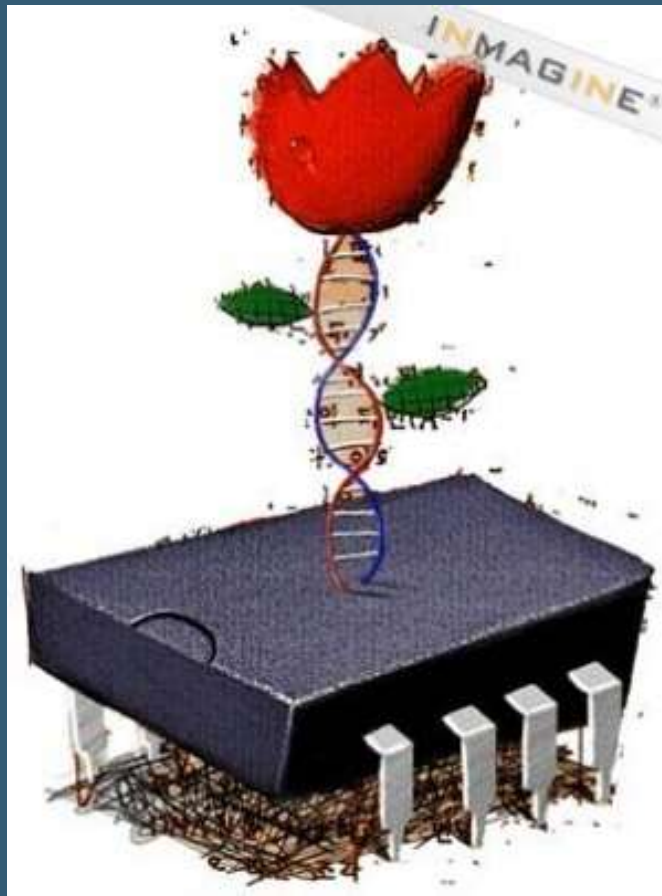


TESTY PATERNITY

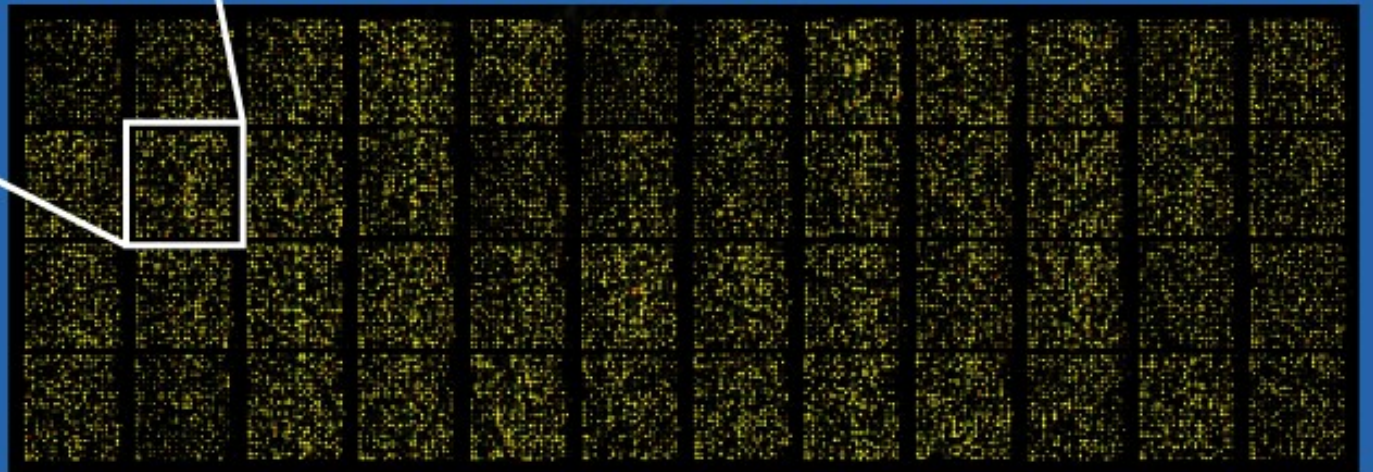
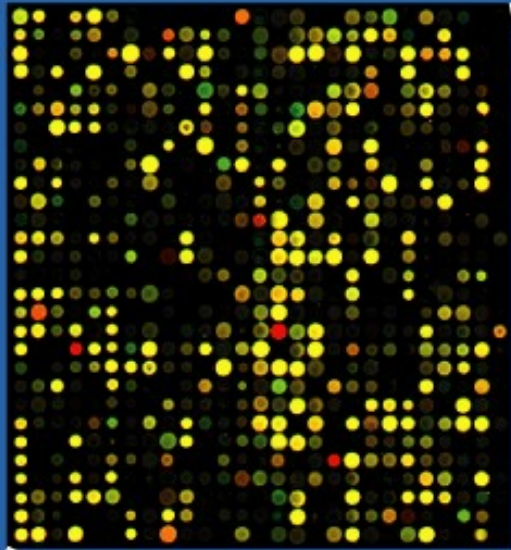
Zjednodušené testy

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

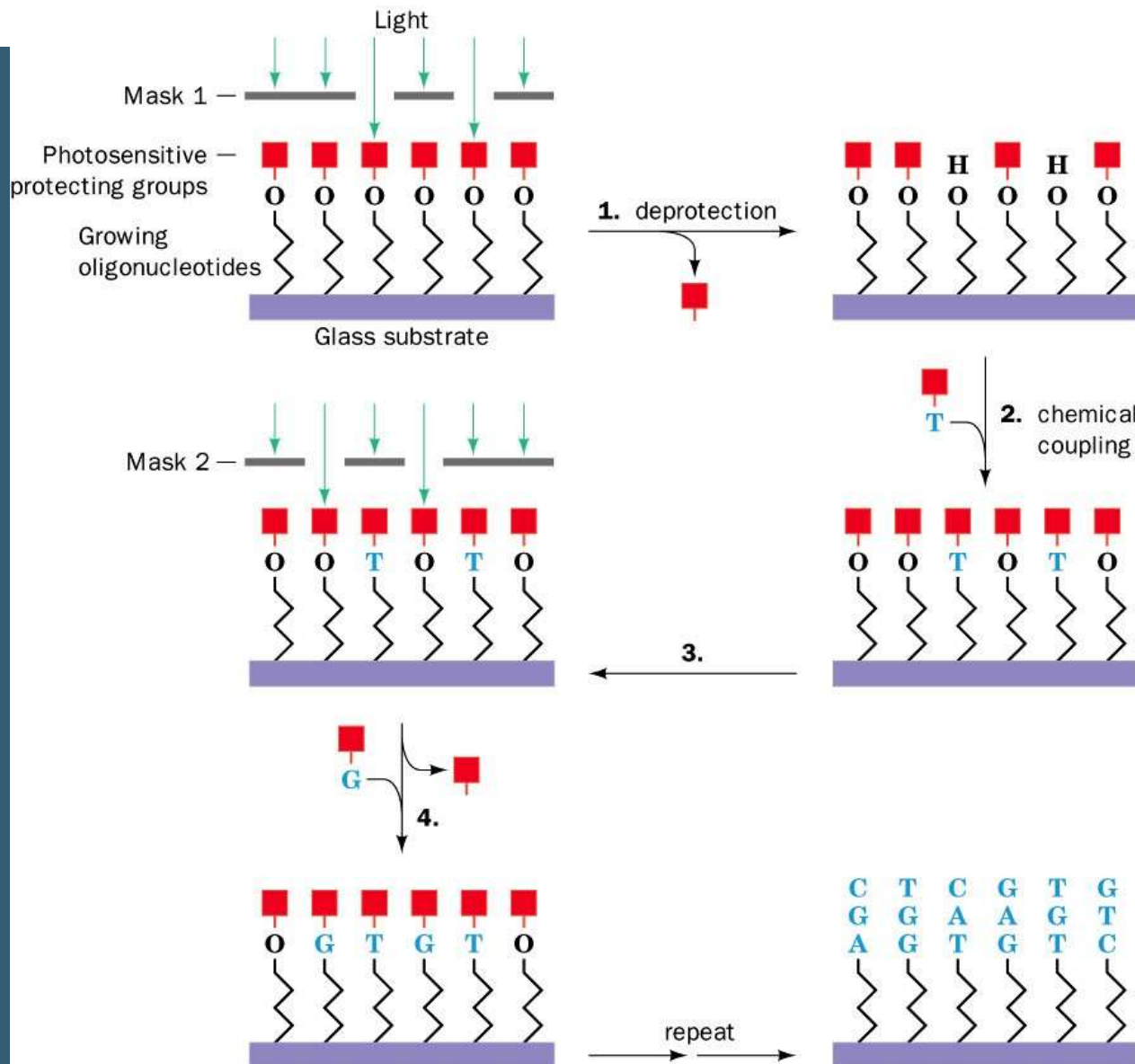
DNA CHIPY



DNA CHIPY



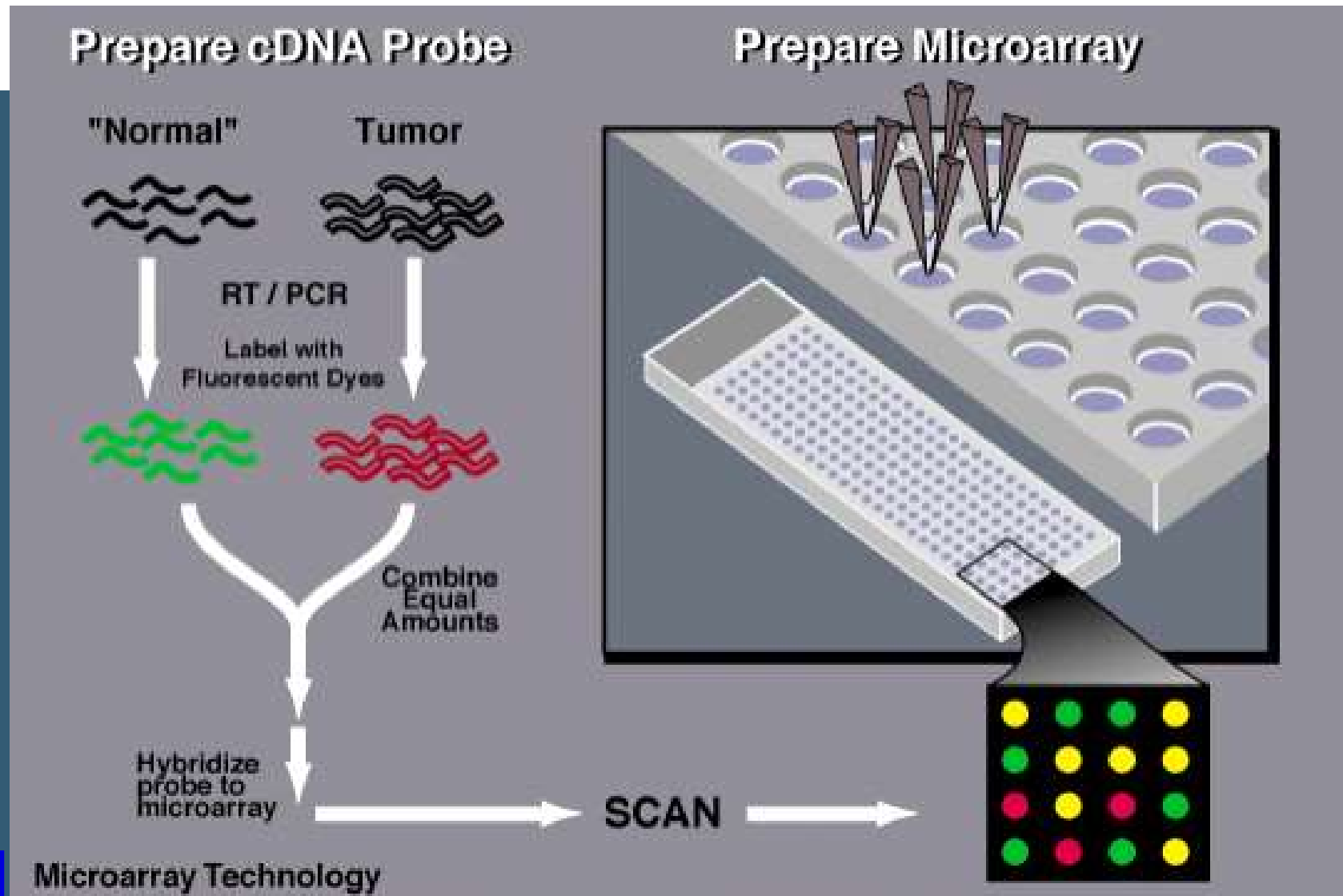
DNA CHIPY



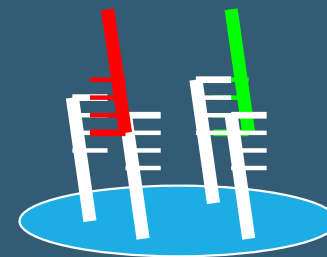
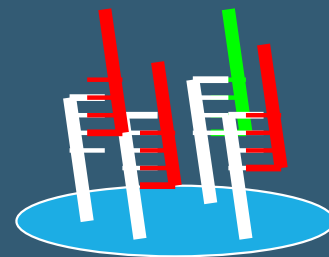
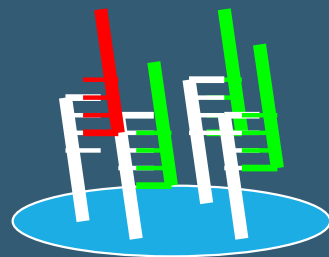
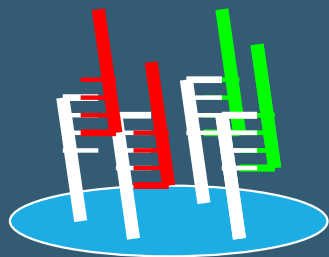
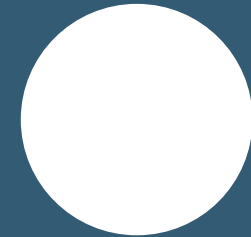
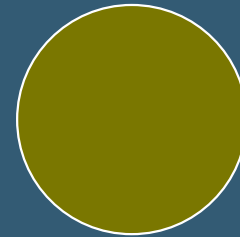
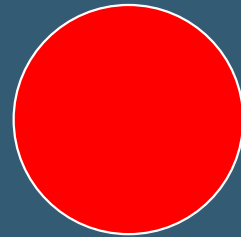
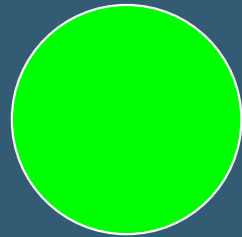
Fixováním sond na pevný povrch je umožněno je prostorově oddělit a paralelizovat hybridizační reakce.

Nukleotidová sekvence je základem pro specificitu daných sond.

DNA CHIPY



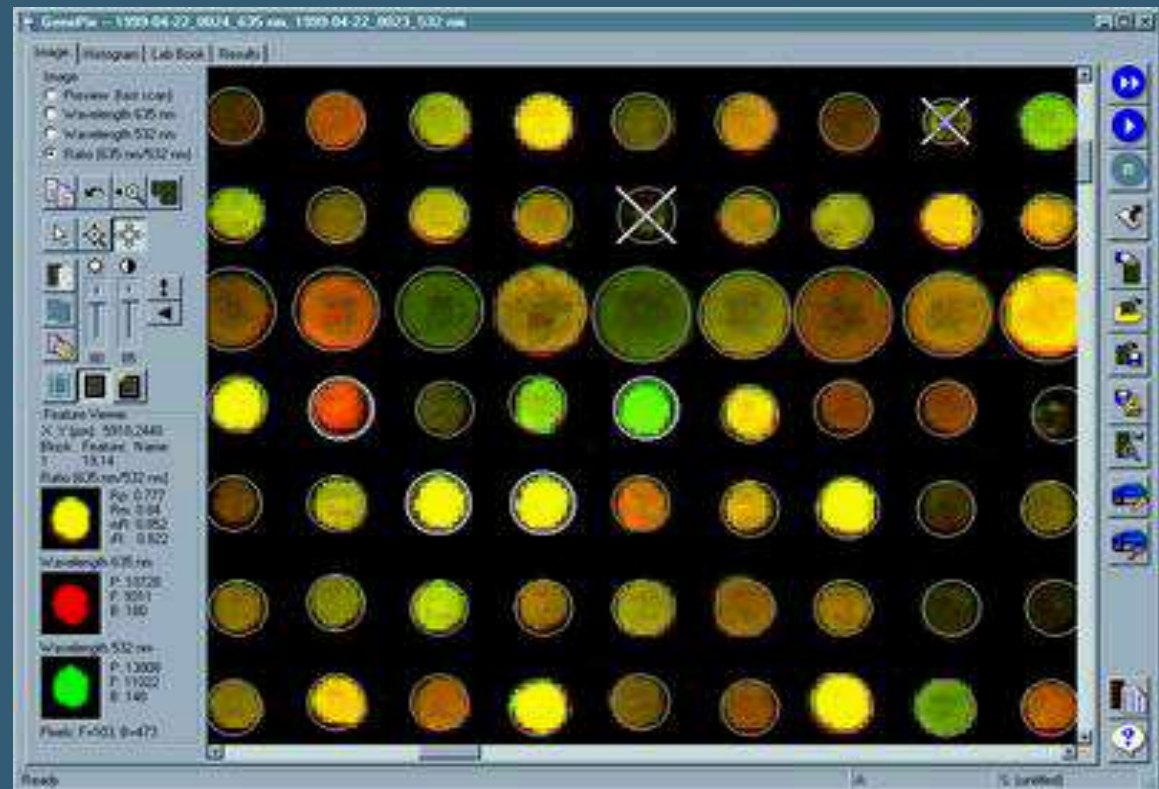
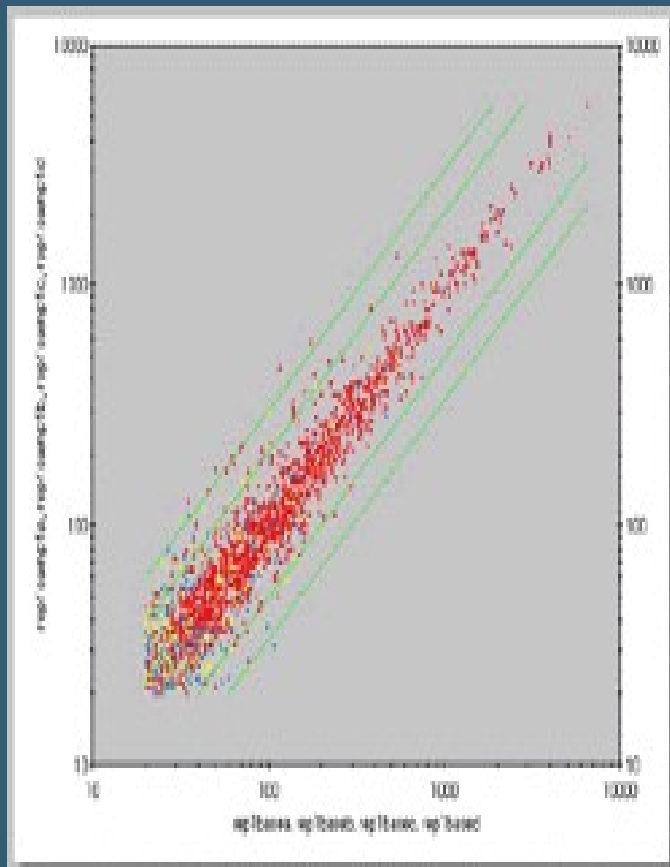
DNA CHIPY - BARVA SKVRN



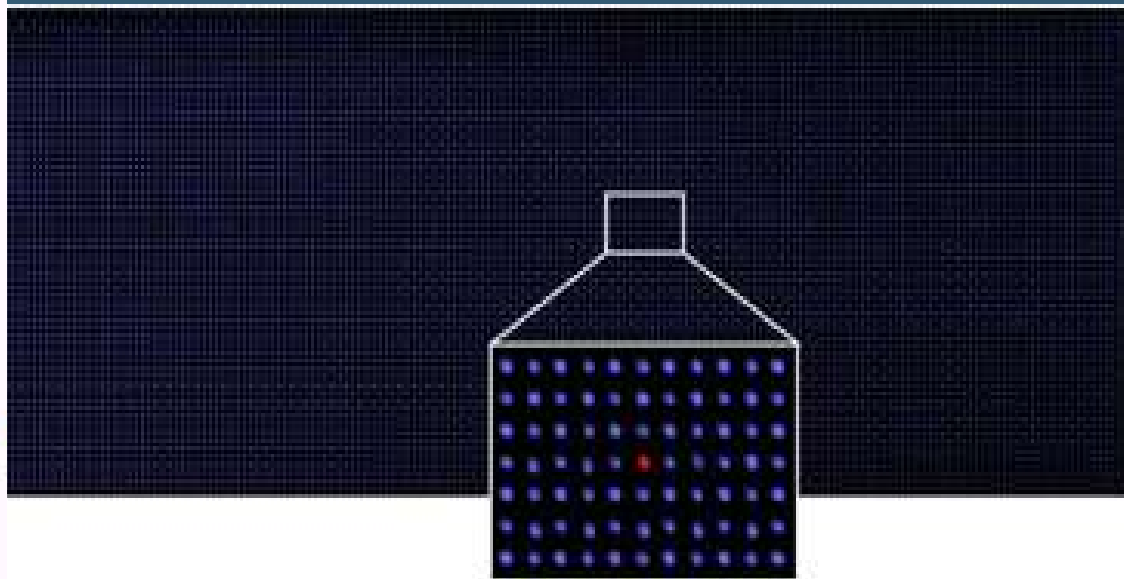
DNA CHIPY - VYBAVENÍ



DNA CHIPY SOFTWARE



PROTEINOVÉ CHIPY

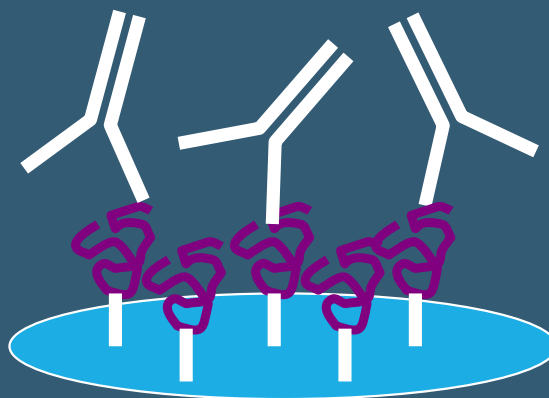


PROTEINOVÉ CHIPY – TYPY INTERAKCÍ

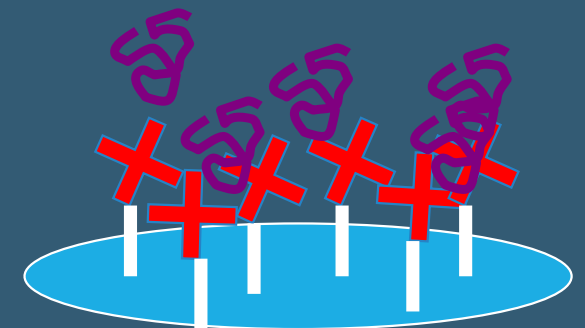
- Protilátka



Antigen



Ligand



Detekce: SELDI MS, fluorescence, SPR, elektrochemická, radioaktivita,

ANTI-GST PROBE

