

Metody rostlinné taxonomie

Molekulární metody v botanice

Polymerázová řetězová reakce PCR (Polymerase Chain Reaction)

Důmyslná metoda pro zmnožení
(amplifikaci) známé sekvence.

Trocha historie

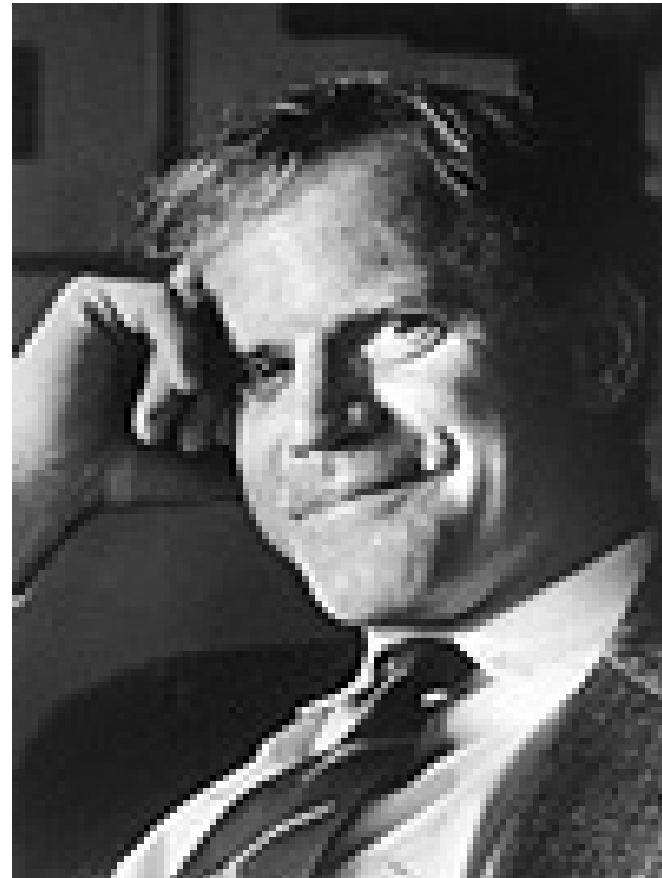
1979 – Kary B. Mullis objevil
principy PCR

1985 – popsána samotná PCR

1993 – Nobelova cena za chemii

Paradox:

1971 - Dr. K. Kleppe a H.G. Khorana publikovali principy na
kterých stojí PCR; jejich nápad však zapadl

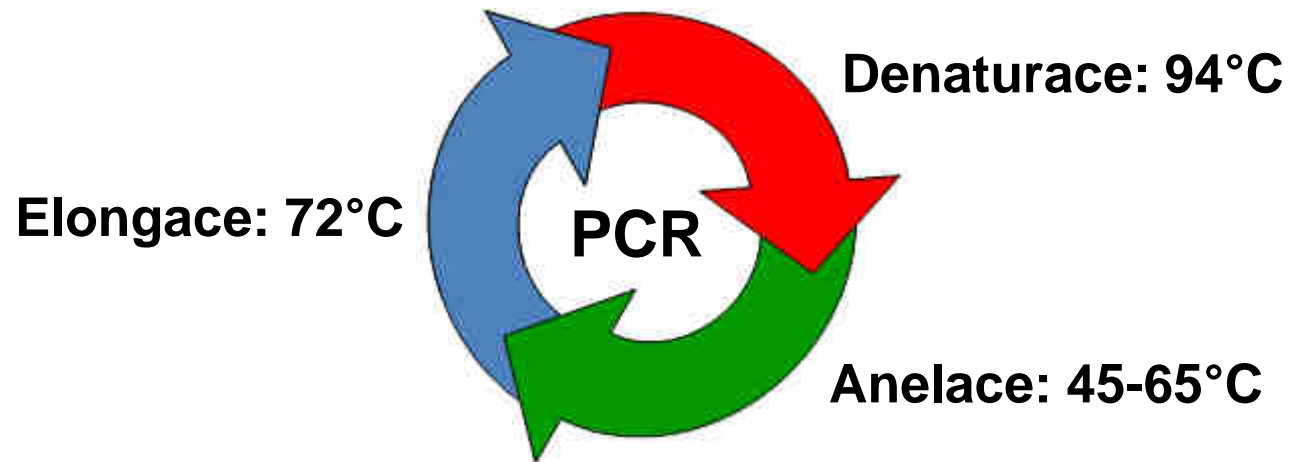
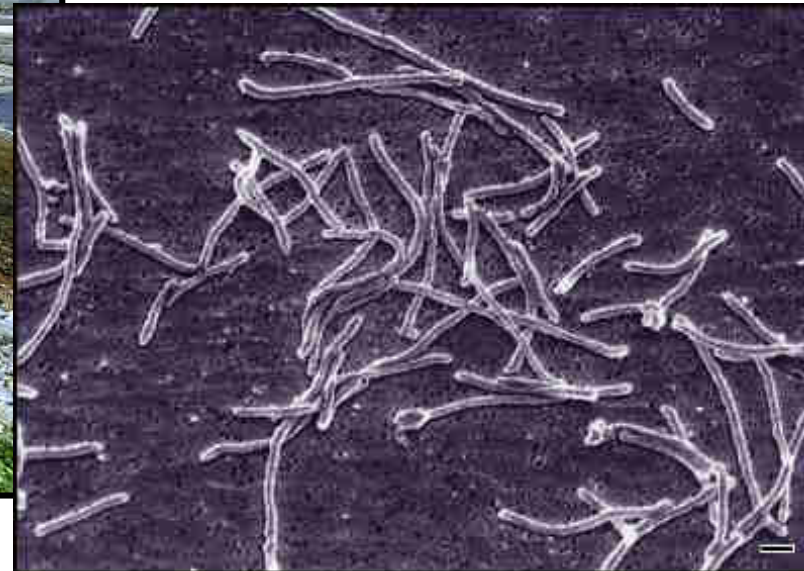


Termostabilní DNA polymeráza



Národní park Yellowstone (USA)

Thermus aquaticus

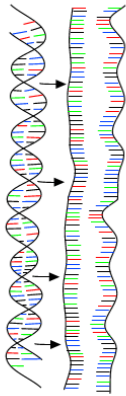


PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

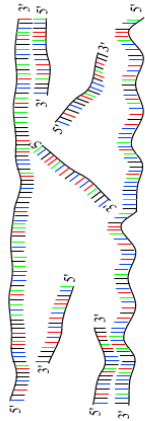
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

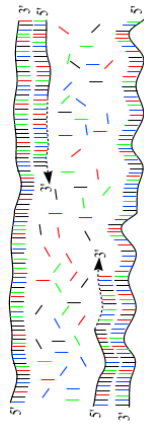
forward and reverse primers !!!



Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTPs



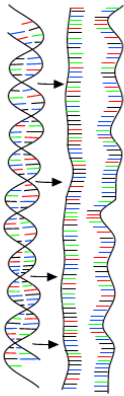
© 2011 Viennaise (1999)

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

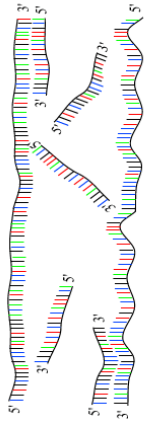
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

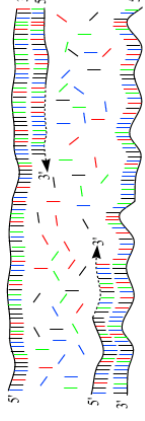
forward and reverse primers !!!



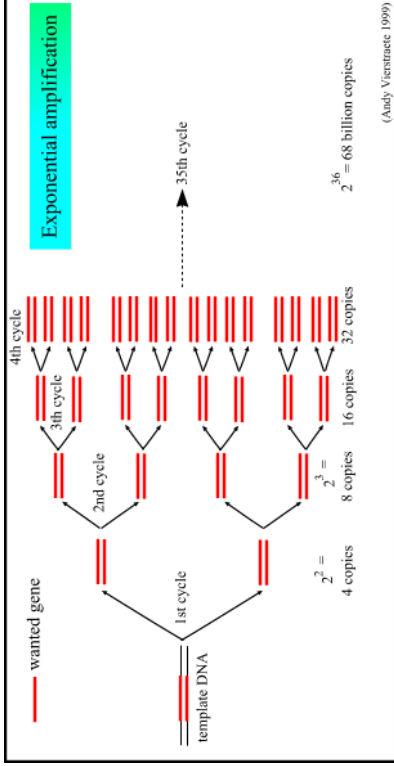
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTPs



(Andy Vierstraete 1999)



PCR - shrnutí

Výhody

- jednoduchost
- rychlost
- velká možnost modifikací základního postupu
- návaznost na další metody
- možnost automatizace
- potřeba 50 –100 ng DNA (v ideálním případě je tedy možné pomnožit DNA úsek z několika buněk)
- v některých případech stačí hrubý extrakt DNA

Nevýhody

- omezená délka amplifikovaného fragmentu (3-15 tis. pb)
- chybovost polymerázy
- obecně nutná znalost cílové sekvence (některé modifikace standardní PCR tuto znalost nevyžadují)
- u rostlinných pletiv častý výskyt inhibitorů PCR
- nespecificita PCR (primerů)

PCR protokol

Komponenta	Pipetovaný objem	Zásobní koncentrace	Finální koncentrace
DNA	1 μ l	?	50 - 100 ng
Taq polymerase	1 μ l	1U/ 1 μ l	1U/ reakce
Primer F	1 μ l	5 μ M	250 nM
Primer R	1 μ l	5 μ M	250 nM
dNTP	0,3 μ l	10 mM (each)	150 nM
Pufr (15 mM MgCl ₂)	2 μ l	10 x	1 x
PCR voda	13,7 μ l		Doplnit do 20 μ l
suma	20 μ l		

PCR program

1x	94°C	2 min
30x	94°C	30 sek
	56°C	30 sek
	72°C	30 sek
4°C	forever	

Molekulární metody odvozené od PCR

Metoda		Známa cílová sekvence	Počet primerů	Specifita primeru	Charakteristika metody
MAAP	RAPD	NE	1	NE	Krátký primer (9-11 pb)
	AP-PCR	NE	1	NE	Krátký primer (18-32 pb)
	DAF	NE	1	NE	Krátký primer (5-8 pb)
AFLP		NE	2	ANO	Ligace adaptorů
Sekvenování		ANO	1+1	ANO	Fluorescenčně značené ddNTP
Mikrosatelity		ANO	2	ANO	Tandemové repetice

MAAP (**M**ultiple **A**rbitrary **A**mplicon **P**rofilng); **RAPD** (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **DNA**); **AP-PCR** (**A**rbitrarily **P**rimed- **P**olymerase **C**hain **R**eaction); **DAF** (**DNA**-**A**mplified **F**ingerprinting); **AFLP** (**A**mplified **F**ragment **L**enth **P**olymorphism)

Molekulární metody

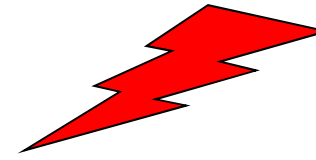
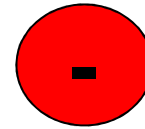
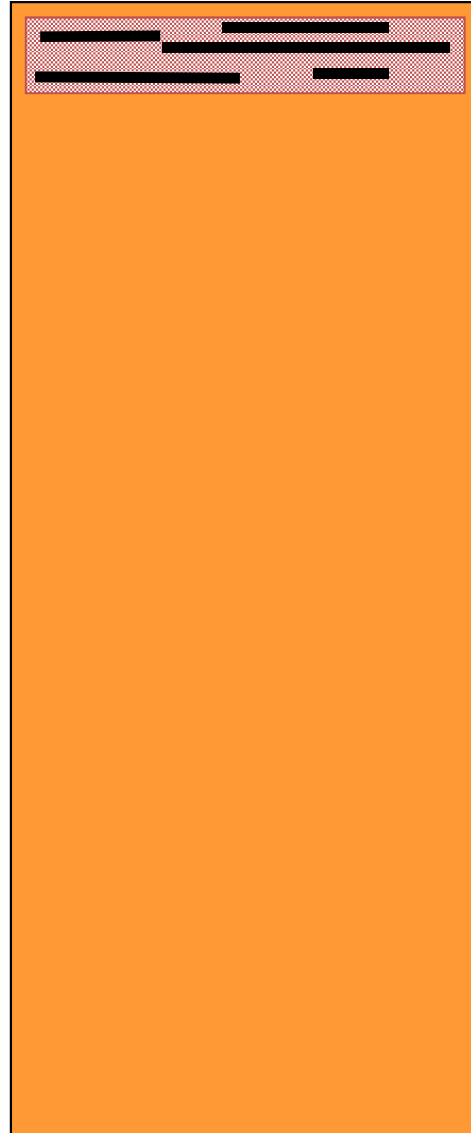
	množství znaků	úroveň polymorfizmu	Opakovatelnost	pracnost	náklady
Izoenzymy	Malé	Malé	Střední	Malá	Malé
RFLP	Velké	Střední	Velká	Velká	Střední
RAPD	Velké	Střední	Malá	Malá	Malé
AFLP	Velké	Střední	Velká	Střední	Střední
Mikrosatelity	Velké	Velké	Velká	Malá	Velké
PCR-sekvencování	Malé	Malé – Velké	Velká	Malá – Velká	Velké

Elektroforéza – separace DNA

DNA má
záporný náboj
díky fosfátovým
skupinám

Agarózový gel

Pufr
TBE vs. TAE

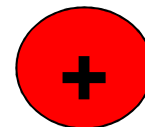


El. proud

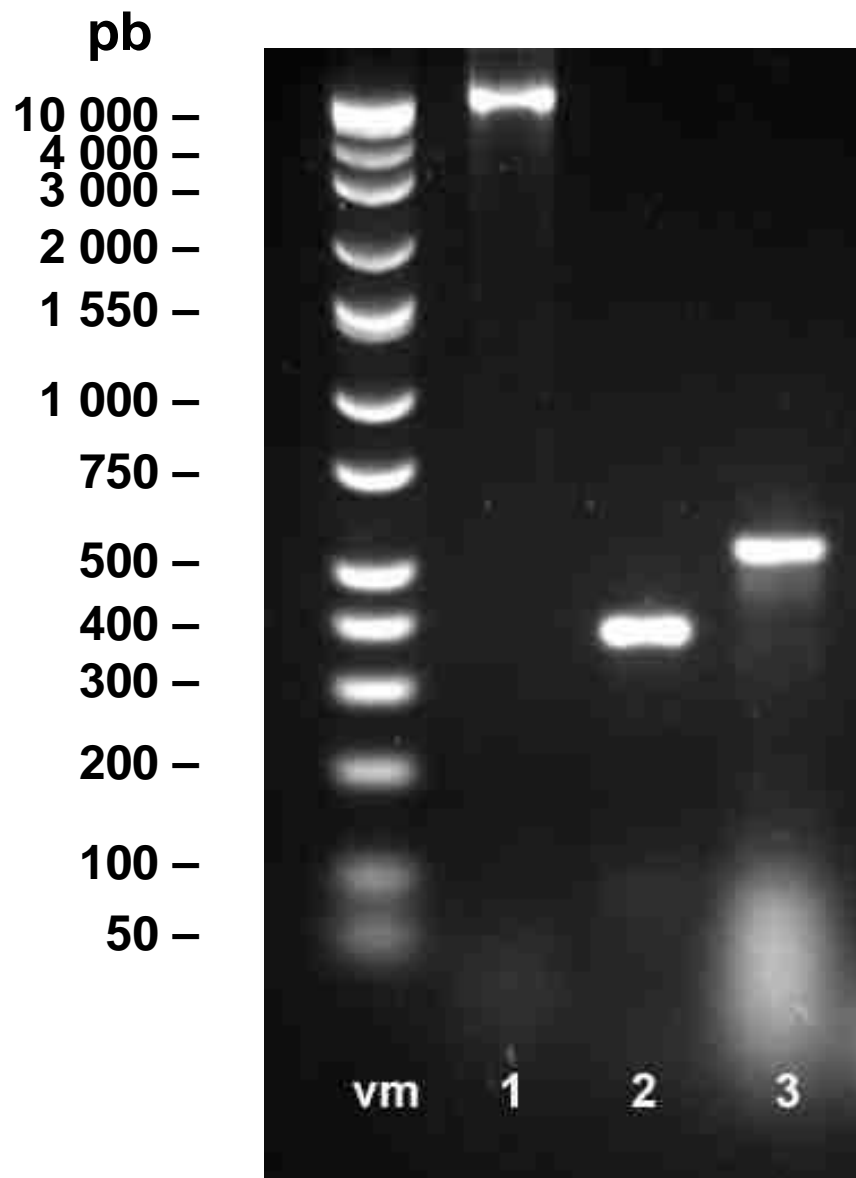
Směr postupu DNA



kratší (lehčí)
fragmenty jsou
pohyblivější
než delší
fragmenty



Elektroforetogram



VM – velikostní marker

1 – genomová DNA

2, 3 – DNA fragmenty

Vizualizace DNA

na DNA se naváže fluorescenční barvivo, které po osvětlení UV zářením fluoreskuje.