

IV107 Bioinformatika I

Přednáška 3

Katedra informačních technologií
Masarykova Univerzita Brno

Jaro 2009

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Před týdnem

DNA nepřímo (přes proteiny) řídí většinu procesů v buňce. Její struktura vykazuje všechny potřebné rysy. Je nositelem genů.

Exprese genů

- ▶ transkripce
- ▶ translace

Struktura proteinů

- ▶ primární (sekvence aminokyselin)
- ▶ sekundární (α , β , etc.)
- ▶ terciární (3-D)
- ▶ kvartérní (makromolekulární komplexy)

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Hemoglobin Chime

An introductory presentation suitable for lectures or individual study.

[\(Deutsch\)](#) [\(Português\)](#)



DNA Structure Chime

An introductory level, nonlinear self-paced tutorial. [\(Deutsch\)](#) [\(Español\)](#) [\(Português\)](#)

'Win-IE6-Compatible'



Antibody Chime

An introductory presentation suitable for lectures or individual study.

[\(Deutsch\)](#)



MHC Chime

The Major Histocompatibility Complex presents peptides from foreign proteins to T lymphocytes, crucial to disease immunity.



Lipid Bilayers and Membrane Channel Chime

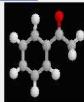
Introduces cholesterol and phospholipids, then proceeds to lipid bilayer and the gramicidin membrane channel embedded within the bilayer. Includes molecular dynamics simulations of both gel and fluid membrane states. By Eric Martz and Angel Herráez. [\(Español\)](#)



Molecular Vibrations: IR Spectrum Chime

by Molyka, Lahiri & Lancashire.

'Win-IE6-Compatible'



Water Chime

Theoretical simulation of 10 water molecules condensing into a hydrogen-bonded droplet. Includes challenge questions for students.

'Win-IE6-Compatible'



Lac repressor Chime

bending the DNA operon as it goes from nonspecific to specific DNA binding.

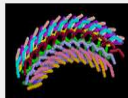
'Win-IE6-Compatible'



Bacterial Flagellar Hook Chime

Bacterial flagella are whip-like organelles that bacteria use to swim about. The hook acts as a molecular universal joint. It's composed of over 100 protein subunits.

'Win-IE6-Compatible'



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

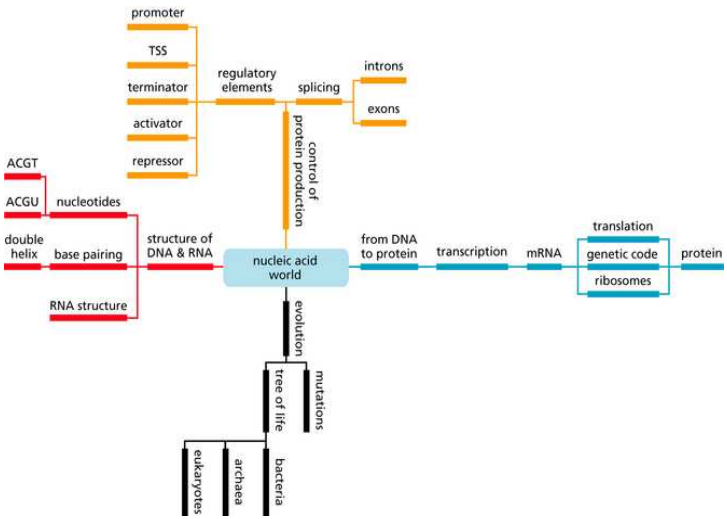
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Schéma 1



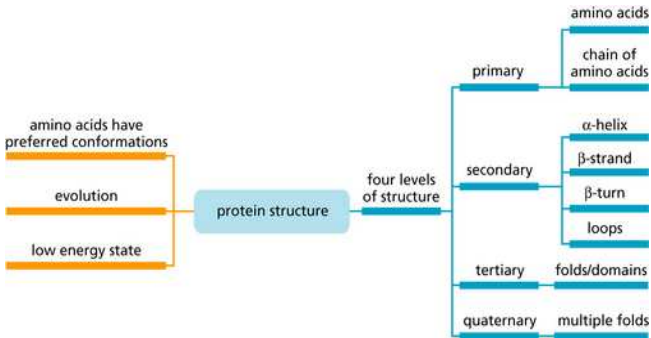
Makromolekuly v laboratoři

- DNA
- Rekombinace DNA a klonování
- Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)
- Detekce hybridizací a sekvenování DNA
- Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Schéma 2



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Outline

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Analýza sekvencí

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Techniky manipulující DNA a RNA

- ▶ Rekombinace DNA a klonování
 - ▶ izolace z buněk
 - ▶ štěpení restrikcími endonukleázami
 - ▶ rekombinace (ligace)
 - ▶ transformace organismů rekombinantní DNA
- ▶ Syntéza, kopírování a amplifikace DNA
 - ▶ syntéza oligonukleotidů
 - ▶ transkripce in vitro
 - ▶ syntéza cDNA
 - ▶ amplifikace pomocí PCR
- ▶ Detekce, analýza a sekvenace
 - ▶ elektroforéza (dělení podle velikosti)
 - ▶ hybridizace se značenými sondami
 - ▶ určování sekvence

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Restrikční endonukleázy

enzym	zdroj	restrikční místo	fragment[kbp]
AluI	Arthrobacter luteus	AG↓CT TC↑GA	0.3
BamHI	Bacillus amyloliquefaciens H	G↓GATC C C CTAG↑G	7.0
EcoRI	Escherischia coli R	G↓AATT C C TTAA↑G	3.1
HaeIII	Haemophilus aegyptus	GG↓CC CC↑GG	0.6
NotI	Norcadia otitidis-caviarum	GC↓GGCC GC CG CCGG↑CG	<9700
PstI	Providencia stuartii	C TGCA↓G G↑ACGT C	7.0
TaqI	Thermus aquaticus	T↓CG A A GC↑T	1.4
HindIII	Haemophilus influenzae Rd	A↓AGCT T T TCGA↓A	3.1

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

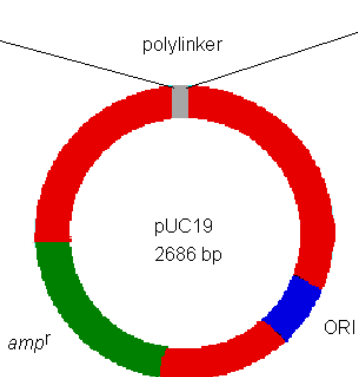
Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Rekombinace a klonování

SacI SmaI XbaI PstI HindIII
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCTGACCTGCAGGCATGCAAGCTT
EcoRI KpnI BamHI SalI SphI



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

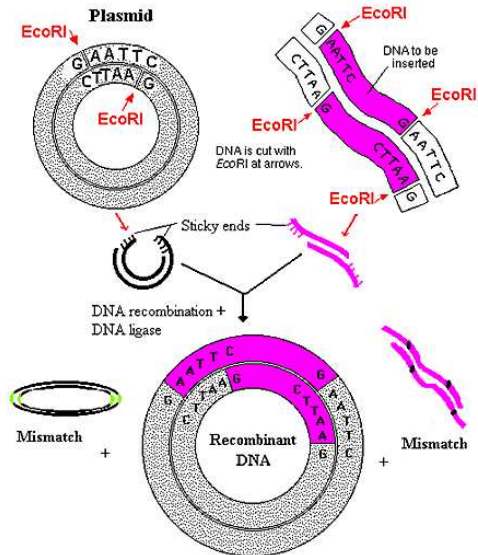
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Rekombinace DNA a klonování



Inserting a DNA Sample into a Plasmid

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

V laboratoři



A

<http://www.ct.gov/dps/cwp/view.asp?a=2155&q=314998>



B

<http://www.sme.sk/c/3753490/Genetika-nadej-pre-pacientov.html>

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

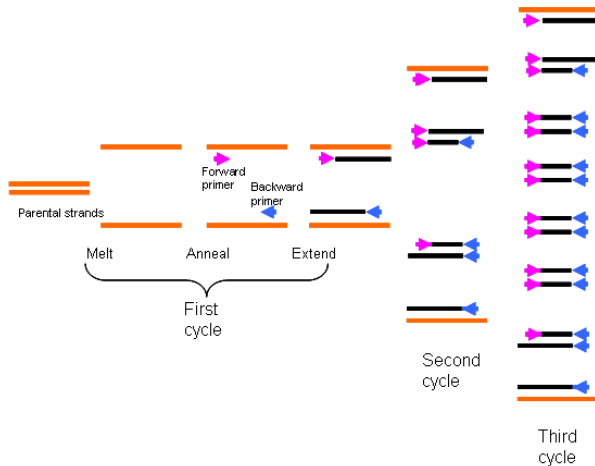
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

PCR (polymerázová řetězová reakce)



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

PCR (polymerázová řetězová reakce)



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

**Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)**

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Sekvence DNA

- ▶ Pořadí nukleotidů ve směru 5' → 3' uloženo pro budoucí generace jako dlouhý řetězec symbolů A, C, G a T
- ▶ Dobrá zpráva pro budoucnost bioinformatiků: zatím je osekvenováno jenom asi 280 organismů, data budou přibývat
 - ▶ Polymorfismus: Rozdíl mezi jedinci Homo sapiens sapiens 1/1000 bazí
 - ▶ Personal Genomics Project (PGP)

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Sekvence DNA

- ▶ Sekvenace se dělá ve dvou fázích
 - ▶ Za použití DNA polymerázy a směsi normálních a modifikovaných deoxyribonukleotidů se syntetizují vlákna DNA (imitace replikace), templátem je sekvenovaná molekula DNA
 - ▶ Produkty polymerizace se v automatických strojích chromatograficky dělí podle velikosti a vypovídají o sekvenci
- ▶ Jedna reakce podá informaci o 500-1000 bázích

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

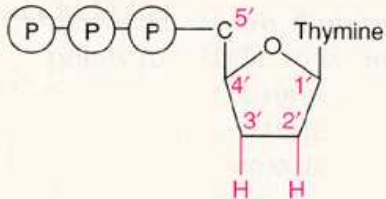
Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Dideoxynukleotid neumožňuje navázání dalších nukleotidů



Dideoxythymidine triphosphate (ddTTP)

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

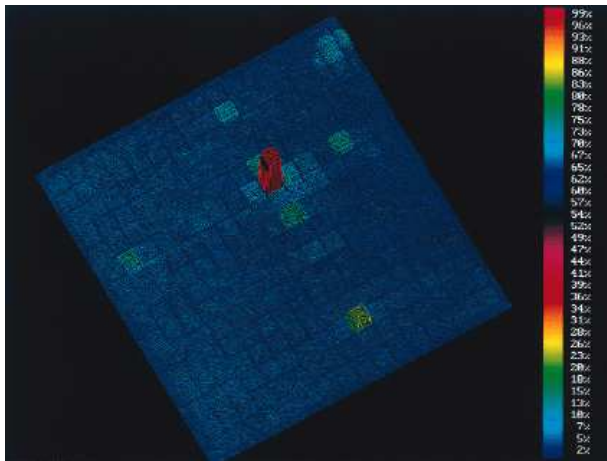
Detekce hybridizací a sekvenování
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Sekvenace hybridizací je založena na vázání se DNA na destičku s různými oligonukleotidy



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

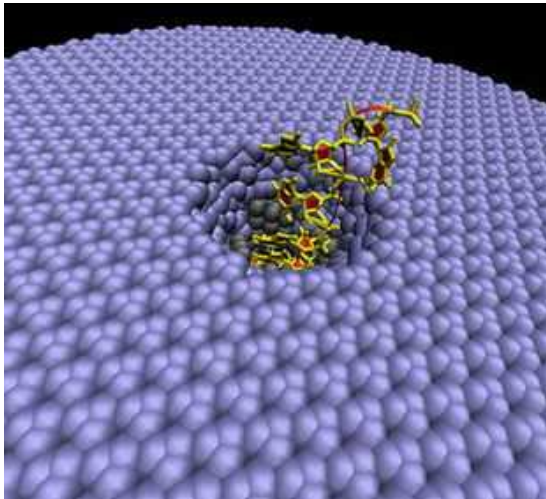
**Detekce hybridizací a sekvenování
DNA**

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Přechod DNA pórem v membráně nitridu silikonu generuje elektrický signál, který by mohl umožnit sekvenování



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Historie sekvenace genomů

1975	bakteriofag MS2	
1977	bakteriofag PhiX174	5,375 bp
1982	bakteriofag Lambda	
1984	HIV-1	
1990	virus HCMV	230 Kbp
1995	H. influenzae	1,83 Mbp
1996	E. coli	4,60 Mbp
1996	S. cerevisiae	12,00 Mbp
1998	C. elegans	96 Mbp
2000	D. melanogaster	120 Mbp
2000	A. thaliana	130 Mbp
2001	H. sapiens	3 000 Mbp
2001	M. musculus	3 000 Mbp

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

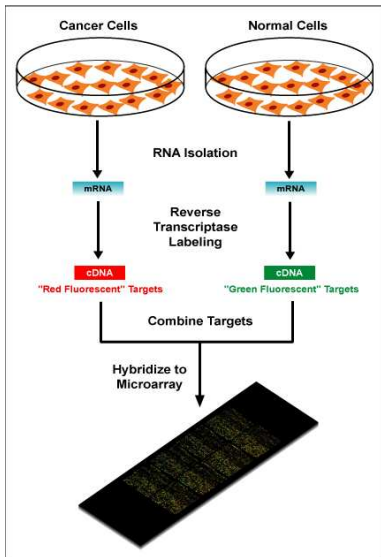
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Microarray



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

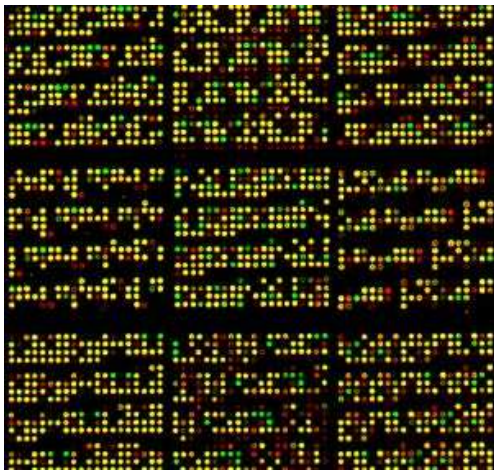
Detekce hybridizací a sekvenování
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Microarray



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Techniky manipulující proteiny

- ▶ izolace z buněk
- ▶ elektroforéza (dělení podle velikosti)
- ▶ zjišťování aktivity
- ▶ štěpení peptidázami
- ▶ určování sekvence
- ▶ generování protilátek pro daný protein
- ▶ ELISA a podobné testy
- ▶ produkce rekombinantních proteinů (např lacZ, GFP)
- ▶ krystalizace a určování struktury
- ▶ hmotnostní spektrometrie

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

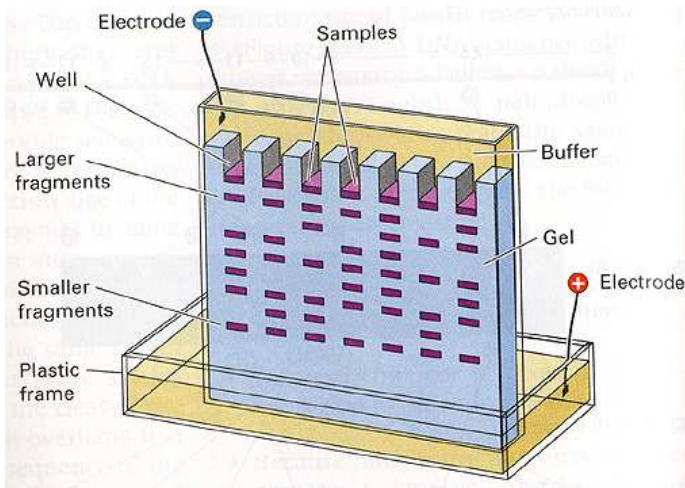
Detekce hybridizací a sekvenování
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

SDS-PAGE (elektroforéza v polyakrylamidovém gelu)



Sodium dodecyl sulfát denaturuje proteiny a dává vzniklým komplexům záporný náboj

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

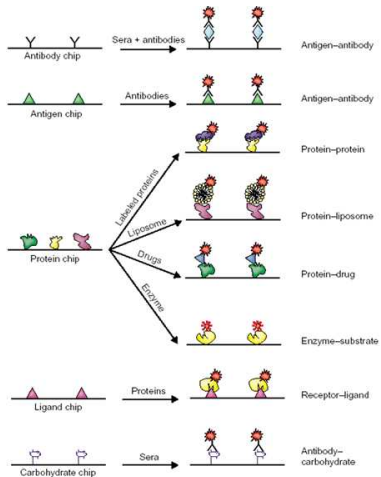
Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Pole na bázi proteinů



Current Opinion in Chemical Biology

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

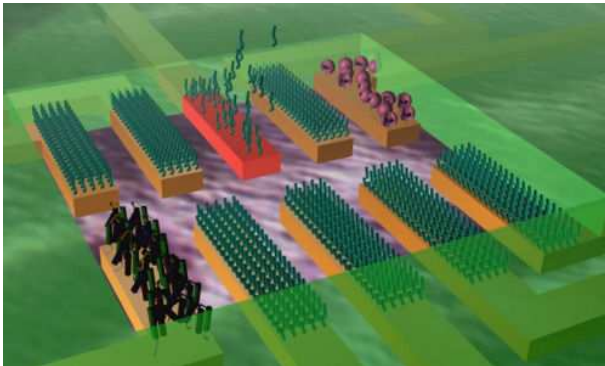
Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Biosenzory v proteinových čípech



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

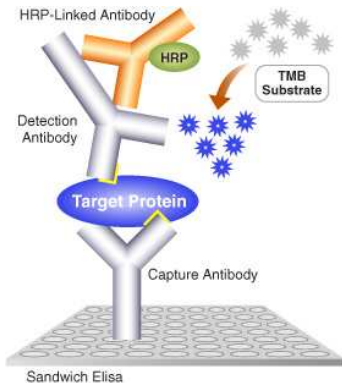
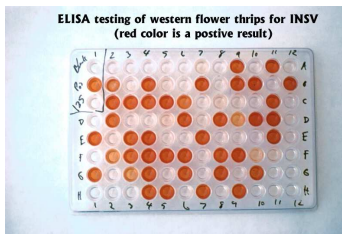
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Slovní pojmy molekulární biologie

central dogma	gene	RNA
genome	ORF	transcription
DNA	gene structure	mRNA
nucleotide	promoter	gene expression
3'/5'	intron	microarray
hybridization	exon	probe
replication	prokaryote	EST
DNA polymerase	ATG	translation
vector	GC content	codon
plasmid	eukaryote	protein
sequence	alignment	TATA proteome
PCR	enhancer	mass spectrometry
DNA sequence	silencer	signal transduction

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Příště Analýza sekvencí

Outline

Dodatek

Dodatek

For Further Reading

Dodatek

For Further Reading

For Further Reading

X