

IV107 Bioinformatika I

Přednáška 3

Katedra informačních technologií
Masarykova Univerzita Brno

Jaro 2010

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

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

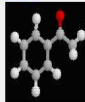
Introduces cholesterol and phospholipids, then proceeds to lipid bilayer and the gramicidin membrane channel embedded within the bilayer. Includes molecular dynamics simulations of both gel and fluid membrane states. By Eric Martz and Angel Herráez. [\(Español\)](#)



[Molecular Vibrations: IR Spectrum](#) Chime

by Molyka, Lahti & 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.

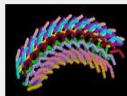
Win-IE6-Compatible



[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

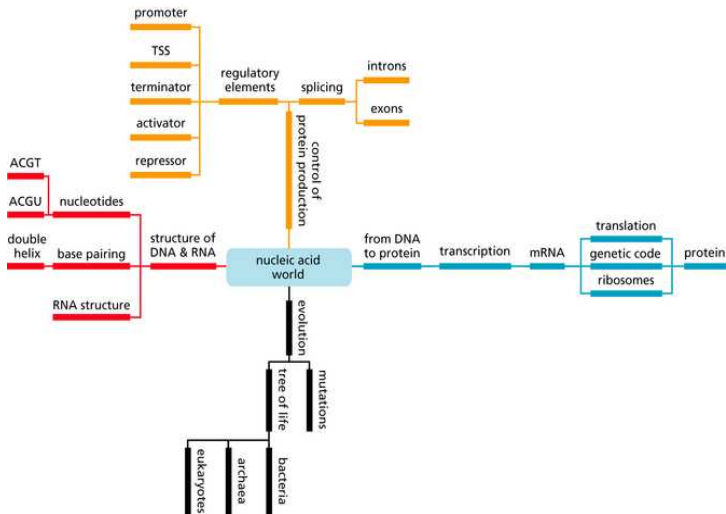
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Schéma 1



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

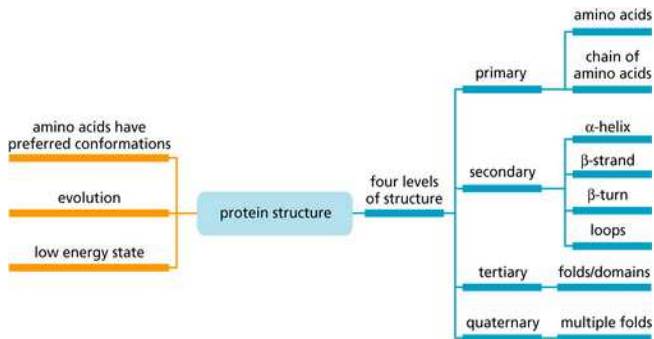
Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí



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

Analýza sekvencí

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
 - ▶ izolace z buněk
 - ▶ štěpení restričními 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

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

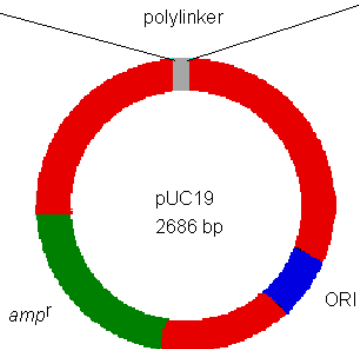
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

SacI SmaI XbaI PstI HindIII
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT
EcoRI KpnI BamHI SalI SphI



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

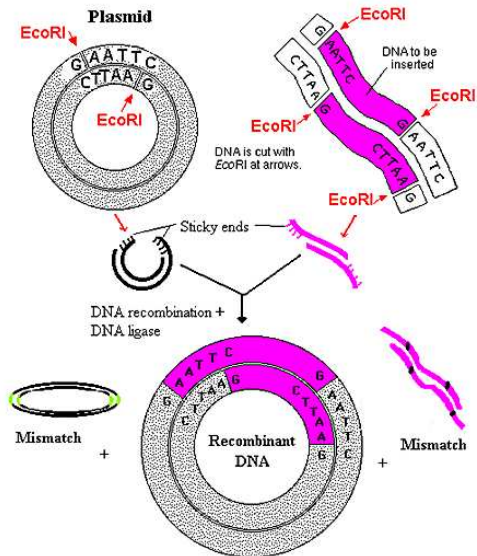
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Rekombinace DNA a klonování



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

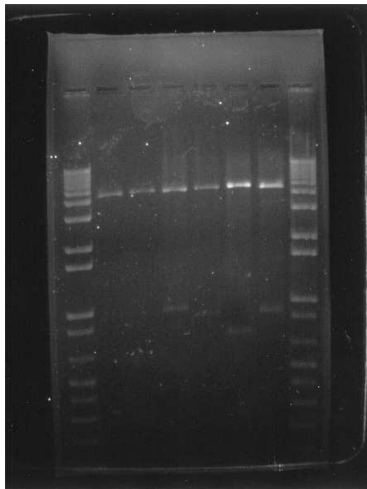
Detekce hybridizací a sekvenování

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



A

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



B

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

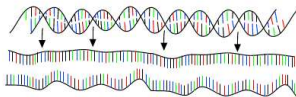
Analýza sekvencí

PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :

Step 1 : denaturation

1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

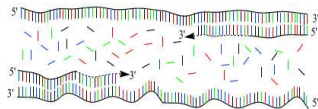
forward and reverse
primers !!!



Step 3 : extension

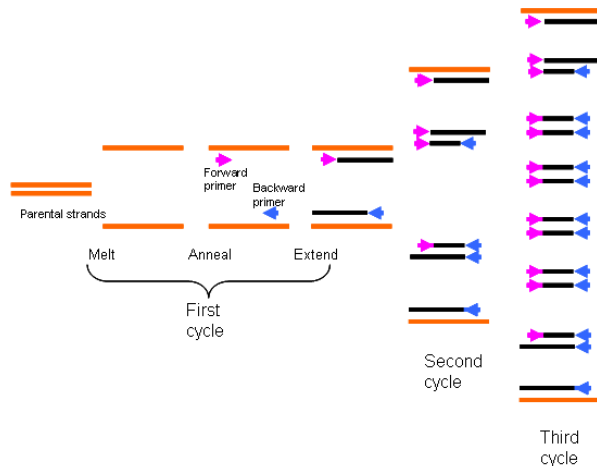
2 minutes 72 °C

only dNTP's



(Andy Veenstra 1999)

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)**

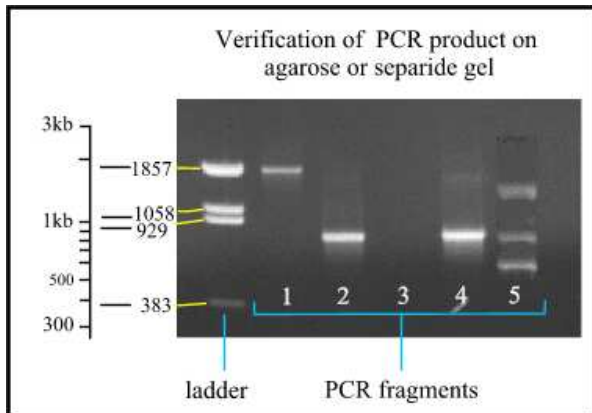
Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí



PCR (polymerázová řetězová reakce)

IV107 Bioinformatika I -
Přednáška 3



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

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

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

- ▶ 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 1000 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

- ▶ 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 dlaších nukleotidů

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

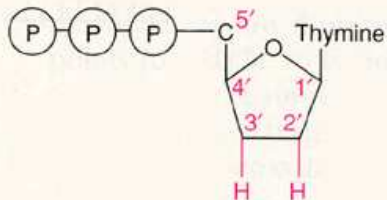
Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

**Detekce hybridizací a sekvenování
DNA**

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí



Dideoxythymidine triphosphate (ddTTP)

Polymeráza se zastaví při použití ddNTP

DNA Polymerase reads the template strand and synthesizes a new second strand to match:



IF 5% of the T nucleotides are actually dideoxy T, then each strand will terminate when it gets a ddT on its growing end:

5' - TACGCGGTACGGTATGTTTCGACCGTTTAGCTACCGAT•
5' - TACGCGGTACGGTATGTTTCGACCGTTTAGCT•
5' - TACGCGGTACGGTATGTTTCGACCGTT•
5' - TACGCGGTACGGTATGTTTCGACCGTT•
5' - TACGCGGTACGGTATGTTTCGACCGT•
5' - TACGCGGTACGGTATGTT•
5' - TACGCGGTACGGTATGT•
5' - TACGCGGTACGGTATG•
5' - TACGCGGTACGGT•
5' - TACGCGGTACGG•
5' - TACGCGGT•

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Výsledek automatického sekvenování

IV107 Bioinformatika I -
Přednáška 3



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Výsledek automatického sekvenování

IV107 Bioinformatika I -
Přednáška 3

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

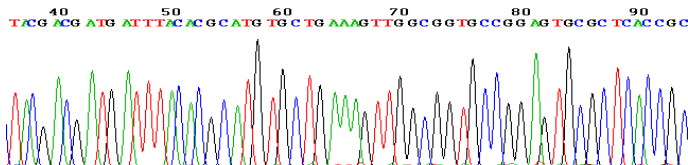
Detekce hybridizací a sekvenování

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

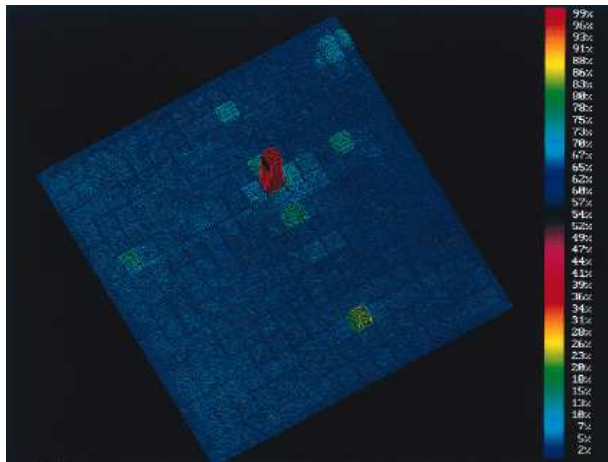
Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

**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)

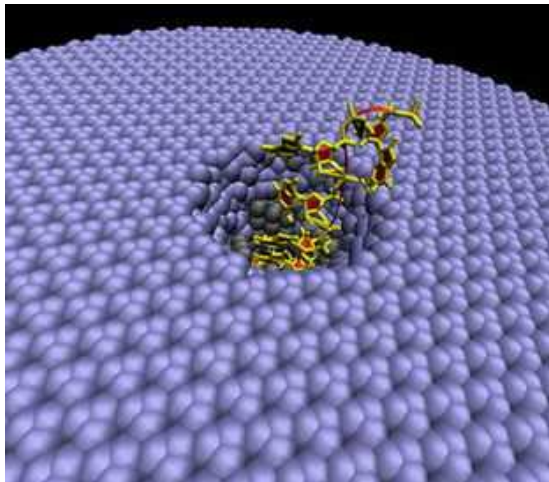
Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí



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)

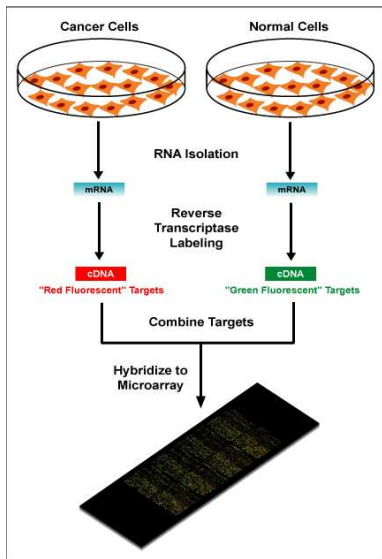
Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí



Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

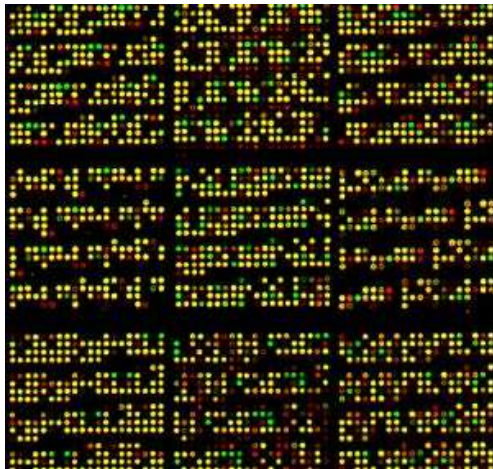
Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

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

- ▶ 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)

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

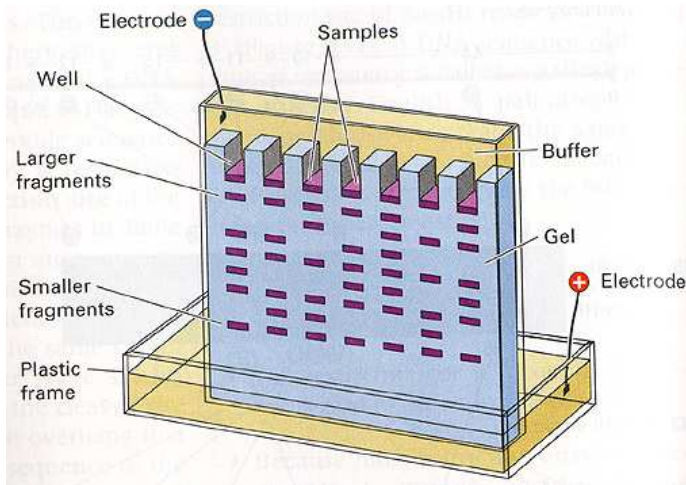
Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování
DNA

Proteiny

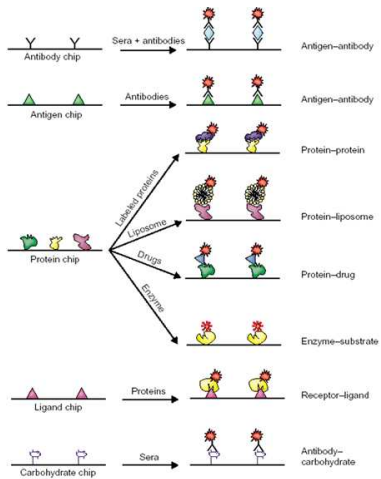
Příště

Analýza sekvencí



Sodium

dodecyl sulfát denaturuje proteiny a dává vzniklým



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

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

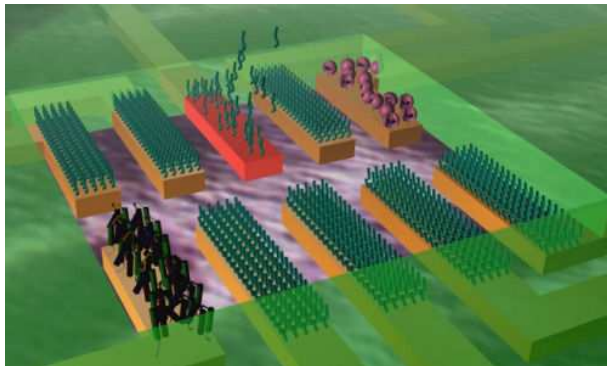
Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování
DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí



ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

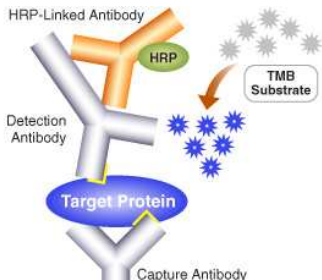
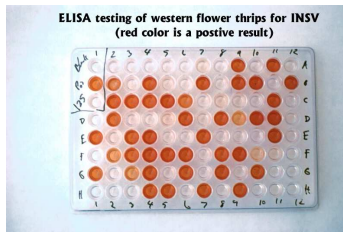
Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí



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
PCR	enhancer	mass spectrometry
DNA sequence	silencer	signal transduction
proteome	antibody	western blot
restriction enzyme	endonuclease	phylogenetics

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR (amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Analýza sekvencí

Makromolekuly v laboratoři

DNA

Rekombinace DNA a klonování

Syntéza, kopírování a PCR
(amplifikace)

Detekce hybridizací a sekvenování

DNA

Proteiny

Příště

Analýza sekvencí

Dodatek

Dodatek

For Further Reading

For Further Reading

Dodatek

For Further Reading

X