

Molekulární biologie

10. Metody molekulární biologie a základy genového inženýrství

Osnova

metody pro studium genomu,
transkriptomu a proteomu
genetické manipulace

Hlavní zdroje:

*S. Rosypal, Úvod do molekulární biologie 1-4
Masarykova Univerzita Brno
ISBN 80-902562*

<https://labguide.cz/>

*M. Muller, Biology of Cells and Organisms
University of Illinois, Chicago*

<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/summer2010/lecturesm10.htm>

Genové inženýrství

Snaha o manipulaci se sekvencí DNA organismu.

Cíle genového inženýrství:

- vylepšit naše vědomostí o tom, jak fungují geny
- vytvářet produkty
- léčit nemoci

Příklad: produkce hormonů pomocí technologie rekombinantní DNA

- např. produkce růstového hormonu při poruchách růstu



Plasmid

Malá kruhová DNA.

- hlavní část bakteriálního genomu je uložena ve velké kruhové molekule DNA - tam jsou "důležité" geny
- na plasmidech jsou "doplňující" geny
- bakterie dokáže přijímat cizí DNA z okolí (hlavně pod stresem) - **Transformace**
- **Konjugace** - výměna plasmidů mezi bakteriemi
- za normálních podmínek není bakteriální ani eukaryotická cytoplazmatická membrána pro DNA propustná

Metody pro navození propustnosti membrány:

Elektroporace

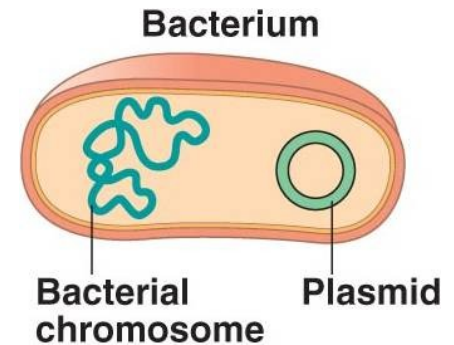
- krátký elektrický šok vytvoří póry v membráně

Chlorid vápenatý (calcium chloride; CaCl_2)

- poskytuje ionty Ca^{2+} , které neutralizují negativní náboj DNA a fosfolipidů buněčných membrán a umožňují DNA vstoupit do buňky

Teplotní šok

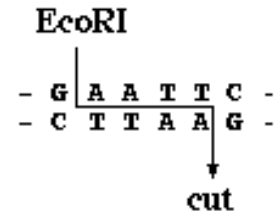
- při 42°C se v bakterii aktivují tzv. heat-shock geny zajišťující přežití ve vyšší teplotě
- použití teplotního šoku po ovlivnění CaCl_2 zvyšuje účinnost transformace



Restrikční endonukleázy

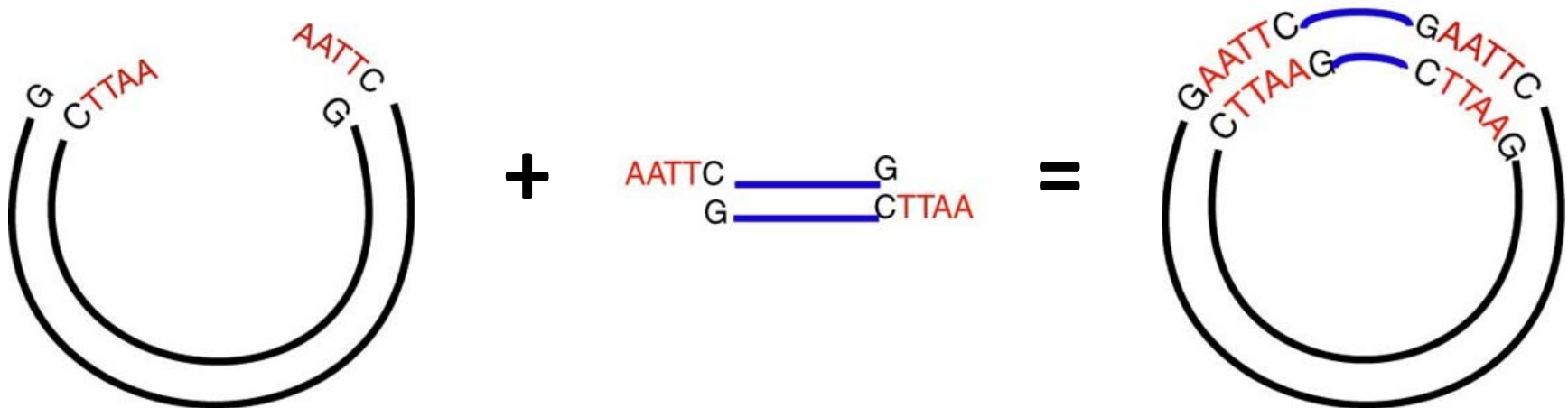
Enzymy, které štěpí DNA.

- štěpení probíhá v místě kódovaném specifickou sekvencí nukleotidů
- přirozeně používány bakteriemi pro štěpení virové DNA



Restrikční místa (rozpoznávací sekvence pro štěpení):

- jsou často palindromy na komplementárních řetězcích
- methylovány (-CH₃), aby chránily bakteriální DNA a štěpily pouze virovou
- často zanechávají "sticky ends", např. EcoRI ("eco R one") u *E. coli*
- "sticky ends" jsou využívány pro vložení genu do plasmidu



Exonukleáza: štěpí DNA od krajů

Endonukleáza: štěpí DNA od prostředku

Helikáza: oddaluje řetězce DNA nebo RNA

Ligáza: spojuje DNA řetězce



Genové inženýrství v praxi

Growth-hormone deficiency (GHD; pituitary dwarfism) - nedostatek růstového hormonu

- hypofýza (pituitary gland) neprodukuje dostatek růstového hormonu (GH; growth hormone; somatotropin)
- léčba: injekce hormonu GH
- do roku 1985 GH získáván autopsií z hypofýzy (většinou mrtvá těla, častá kontaminace)
- od roku 1985 je GH vyráběn v geneticky upravené bakterii *E. coli* technologií rekombinantní DNA (rHGH; recombinant human growth hormone)



Většina případů trpasličího vzrůstu je dána dvěma poruchami: 1. Achondroplasia (70%) a 2. GDH

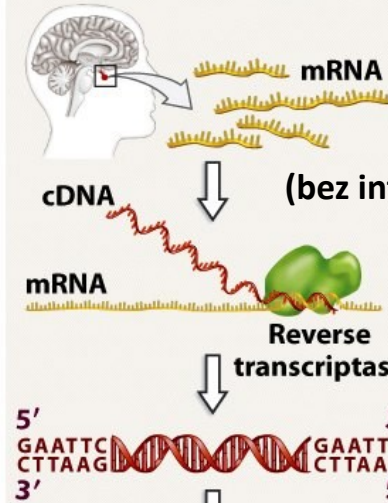
Výroba rekombinantního GH

- izolujeme mRNA z buněk hypofýzy (různé typy mRNA, nejen mRNA pro GH)
- pomocí reverzní transkriptázy přepíšeme mRNA do cDNA
- připojení míst, která rozeznává endonukleáza ke koncům každé cDNA
- cDNA vložíme do přichystaného plasmidu s genem na resistenci proti vybranému ATB - při štěpení endonukleázou vznikají tzv. "sticky ends" (komplementární báze)
- cDNA "vlepi" do plasmidu tzv. ligací za katalýzy DNA-ligázou
- vložíme plasmidy do bakterií *E. coli* - ATB v mediu → přežijí pouze bakterie, které přijmou plazmid
- takovou kolekci bakterií nazýváme cDNA knihovna
- nyní musíme najít pouze bakterie, které přijmou GH gen (různé cDNA podle různých mRNA)

cDNA (complementary DNA): dvouřetězcová DNA syntetizovaná podle templátu mRNA za katalýzy enzymem reverzní transkriptáza
DNA-ligáza: enzym usnadňující spojení DNA řetězců katalýzou formace fosfodiesterové vazby

cDNA knihovna: kombinace cDNA vložených do hostitele (bakterií), které tvoří část transkriptomu. cDNA podle sestřižené mRNA už neobsahuje introny a je v prokaryotním organismu připravena k translaci

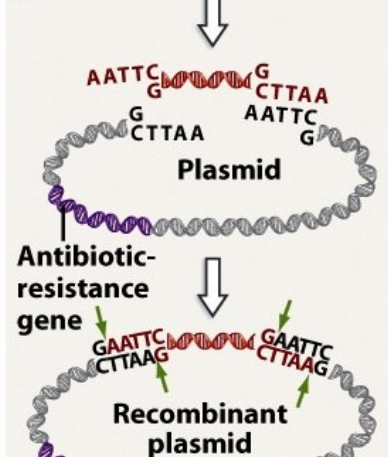
CREATING A cDNA LIBRARY THAT CONTAINS THE HUMAN GROWTH HORMONE GENE



1. Isolate mRNAs from cells in pituitary gland.

2. Use reverse transcriptase to synthesize a cDNA from each mRNA.

3. Attach a restriction endonuclease recognition site to ends of each cDNA.



4. Cut cDNAs and plasmids with restriction endonucleases; remaining sticky ends join by complementary base pairing.

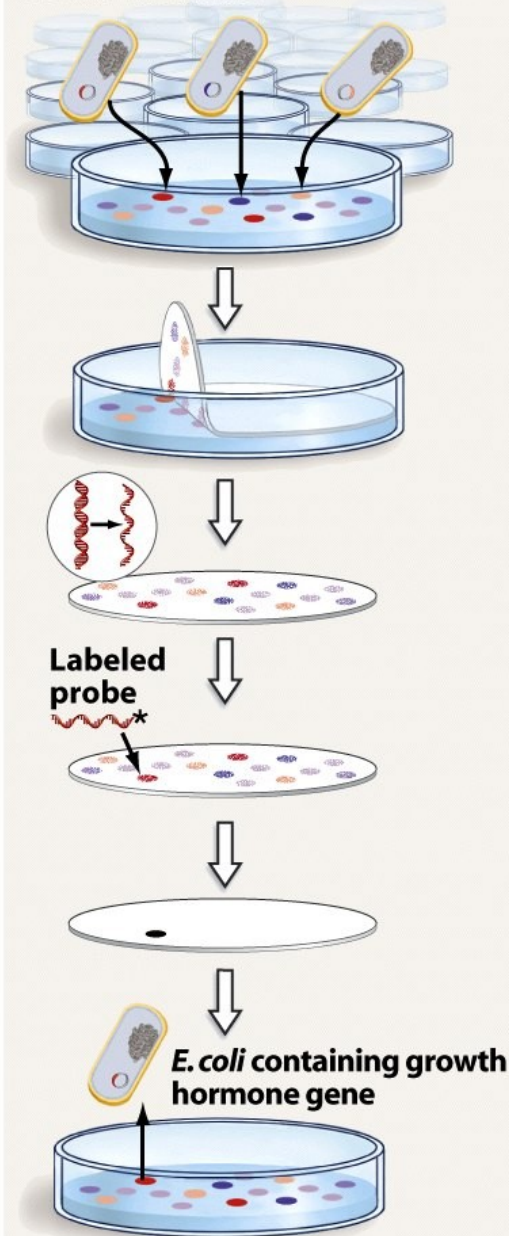
5. Ligate cDNAs and plasmids with DNA ligase.

6. Introduce recombinant plasmids into *E. coli* cells via treatment that makes cells permeable to DNA. Grow cells in presence of antibiotic. Cells that can grow become part of cDNA library. Each cell contains one type of recombinant plasmid and thus one cDNA.

Výroba rekombinantního GH

- na Petriho misky s koloniemi položíme filtrační papír - kolonie *E. coli* se přilepí
- rozdělíme dvoušroubovici DNA na jednořetězce a inkubujeme se sondou
- sonda - krátká sekvence DNA, která odpovídá sekvenci v požadovaném genu (značená radioaktivně)
- RTG film vytvoří značky na místech s radioaktivní DNA sondou
- tyto kolonie namnožíme

FINDING THE GROWTH HORMONE GENE IN A cDNA LIBRARY



1. Grow *E. coli* cells containing plasmids on many plates. Each colony contains a different cDNA.

2. Lay a filter on each plate, then remove. Some cells from each colony stick to filters.

3. Treat filters with chemical to make DNAs single stranded.

4. Probe filters with labeled DNA (short sequence inferred from amino acid sequence of growth hormone).

5. Labeled probe and growth hormone cDNA base pair. Lay X-ray film over filters; black spot marks location of

6. On original plates, find colony of *E. coli* cells that contains growth hormone gene. Sample cells, grow, and analyze.

Figure 19-4 Biological Science, 2/e

Další příklady genového inženýrství v praxi

Chymosin

- enzym používaný pro výrobu sýru
- první rekombinantní protein schválený v potravinářství
- produkce v *E. coli*



Inzulin

- rekombinantní inzulin kompletně nahradil inzulin izolovaný ze zvířecích tkání
- lidský gen pro inzulin vložený do *E. coli* nebo kvasinek *Saccharomyces Cerevisiae*



Faktor VII

- plazmatický koagulační faktor pro hemofiliky
- dříve izolován z krve dárců - riziko přenosu nemocí, nyní izolován z rekombinantních křeččích ledvinných buněk (Baby Hamster Kidney Cells; BHK cells)

Vakcína proti žloutence typu B

- povrchové antigeny viru se produkují v kvasinkách

Rostliny rezistentní k herbicidům

- např. sója, kukuřice, bavlna
- vložen rekombinantní gen zajišťující rezistenci proti herbicidu glyfosátu (Roundup)



Genové inženýrství v praxi

Úprava genomu eukaryotických organismů

1. Agrobacterium tumefaciens

- gramnegativní bakterie - rostlinný parazit s přirozenou schopností genového transferu
- infikuje dvouděložné rostliny (brambory, rajčata a tabák)
- začleňuje do genomu rostliny Ti-plazmid (T-DNA)
- Ti-plazmid obsahuje geny pro produkci rostlinných hormonů
- tvorba nádoru produkujícího aminokyseliny "opiny", sloužící agrobakteriím jako energetický zdroj
- upravený Ti-plazmid je používán v genovém inženýrství u rostlin



2. Gene gun

- pro rostliny, které nejsou napadány Agrobakterií (jednoděložné: pšenice či kukuřice)
- DNA je zkombinována s částicemi zlata a pod tlakem "vstřelena" do buněk
- v buňce se DNA oddělí a je transportována do jádra



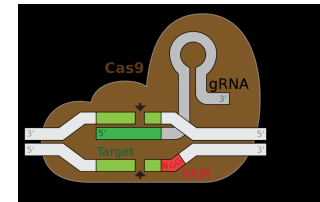
3. Elektroporace

- pro živočišné buňky a rostlinná pletiva, která neobsahují buněčnou stěnu



4. CRISPR

- vektorový systém pro editaci genomu eukaryotických buněk
- rostlinné i živočišné buňky



CRISPR - krok 1: vytvoření DNA DSB (double strand break)

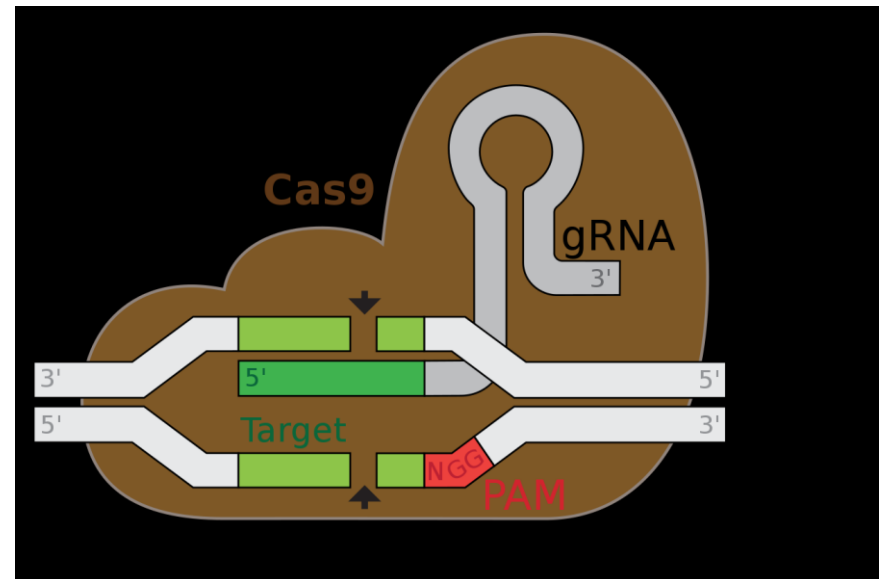
Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

- editace genomu budoucnosti - přesně nalezne místo na genomu, které chceme upravit
- mechanismus adaptivní imunity bakterií (CRISPR/Cas9)
- RNA-guided DNA-nukleáza je přirozeně využívána bakteriemi k inaktivaci virové DNA
- modifikován pro využití k úpravě genomu eukaryot (CRISPR/Cas typ II z *Streptococcus pyogenes*)
- 2 komponenty
 1. **Cas9 protein** (endonukleáza)
 2. nekódující **guide RNA** (gRNA)
- zvolíme si 20 nukleotidů dlouhou sekvenci na gRNA, komplementární s místem na genomu, které chceme štěpit
- po navázání gRNA na toto místo, Cas9 zde vytváří na **DNA dvouřetězcový zlom (DSB)**

DSB lze využít

- a) sám o sobě k **umlčení genu**
- b) **vložení jiného genu**

PAM (*protospacer adjacent motif*) je krátká sekvence DNA (obvykle o délce 2-6 párů bází), která následuje po oblasti DNA, na kterou je zacíleno štěpení systémem CRISPR-Cas9. PAM je nezbytná pro štěpení Cas nukleázy a obecně se nachází 3-4 nukleotidy po směru od místa štěpení.



CRISPR - krok 2: vložení genu do místa DNA DSB

- DNA dvouřetězcové zlomy mohou být opraveny dvěma mechanismy:

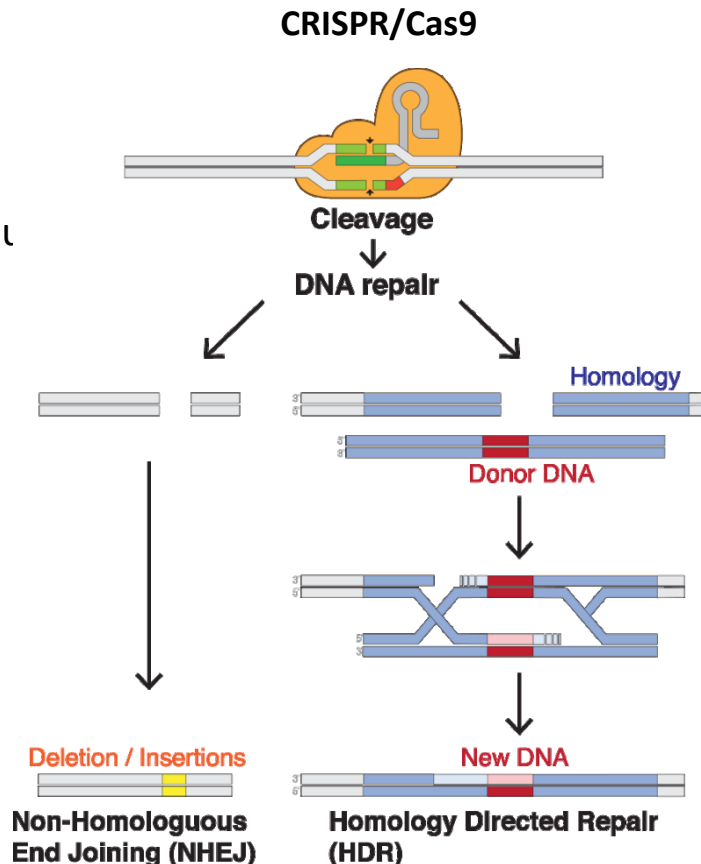
1. Non-homologous end joining (NHEJ)

2. Homologní rekombinace (HR)

- pokud do buňky zároveň vložíme **templátovou DNA**, pak je šance na zabudování této nové DNA právě ve zvoleném místě, kde jsme vytvořili dvouřetězcový zlom pomocí CRISPR/Cas9

1. NHEJ

- Fáze G1 buněčného cyklu
- Chybovost



2. HR

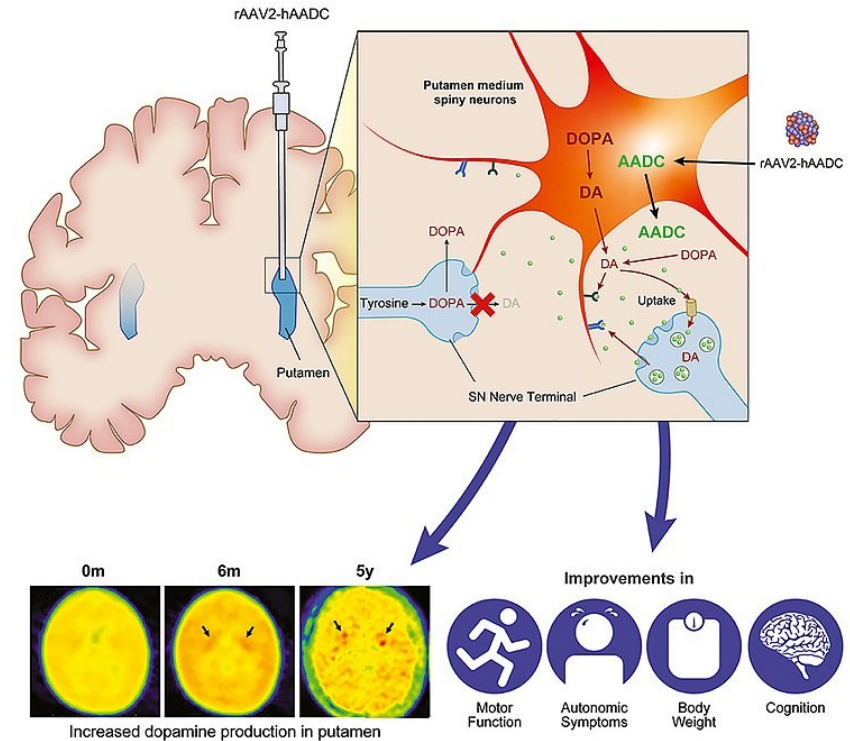
- § Fáze S/G2 buněčného cyklu
- § Velmi malá chybovost

templát je:

1. sesterská chromatida v S/G2
2. nesesterská chromatida v G1
- 3. exogenní DNA templát**

Genová terapie

- **AADC syndrom** je velmi vzácné onemocnění (130 dětí na celém světě)
- **dekarboxyláza aromatických L-aminokyselin (AADC)** je **enzym podílející se na tvorbě neurotransmiterů** (dopaminu a serotoninu), které jsou zodpovědné za komunikaci mezi neurony v nervovém systému
- u pacientů s deficitem AADC je typické **opoždění vývoje**, slabý svalový tonus a neschopnost ovládat pohyby končetin
- **lék Upstaza obsahuje vektor** na bázi nereplikujícího se rekombinantního adenoasociovaného viru sérotypu 2 (AAV2; neintegruje se do genomu pacienta) **obsahující cDNA lidského genu AADC**
- vektor je produkován v lidských embryonálních ledvinových buňkách technologií **rekombinantní DNA**
- po podání léku jsou pacienti schopni ovládat hlavu a sedět bez pomoci
- v r. 2024 dvouletý Martínek z ČR podstoupil léčbu Upstazou ve Francii za 100 mil. Kč



PCR - Polymerase Chain Reaction

Metoda pro masivní replikaci úseku DNA



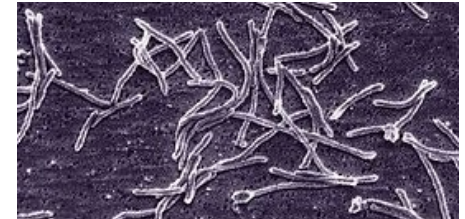
Kary Mullis

Kary Mullis

- metodu vynalezl počátkem 80. let
- 1993 - Nobelova cena - jediná za výzkum v komerční biotechnologické firmě (Cetus)
- používal dva primery, které ohraničily úsek DNA, který chtěl amplifikovat
- nově vytvořená DNA se musela denaturovat (oddělit oba řetězce) při teplotě nad 90°C, aby mohl začít další cyklus amplifikace
- teplotou nad 90°C se ovšem inaktivovala DNA Polymeráza I
- musela tedy být přidána nová Polymeráza při každém cyklu

Taq Polymeráza

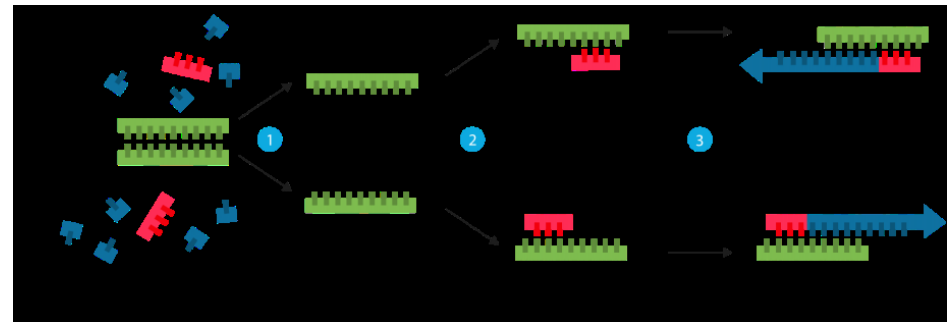
- původně izolována r. 1976 z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*
- bakterie žije v termálních pramenech (gejzír v parku Yellowstone; 70°C)
- optimální aktivita Taq Polymerázy je 75-80°C (vydrží 95°C až 40 min)
- při 73°C připojuje 100 bází za sekundu



Patent

- Roche koupil r. 1993 patent na PCR od Cetus Corp. za \$330 milionů
- odhadovaný výtěžek pro Roche je \$2 miliardy

1. Denaturation (90°C)
2. Annealing (55°C)
3. Extension (73°C)



PCR - Polymerase Chain Reaction

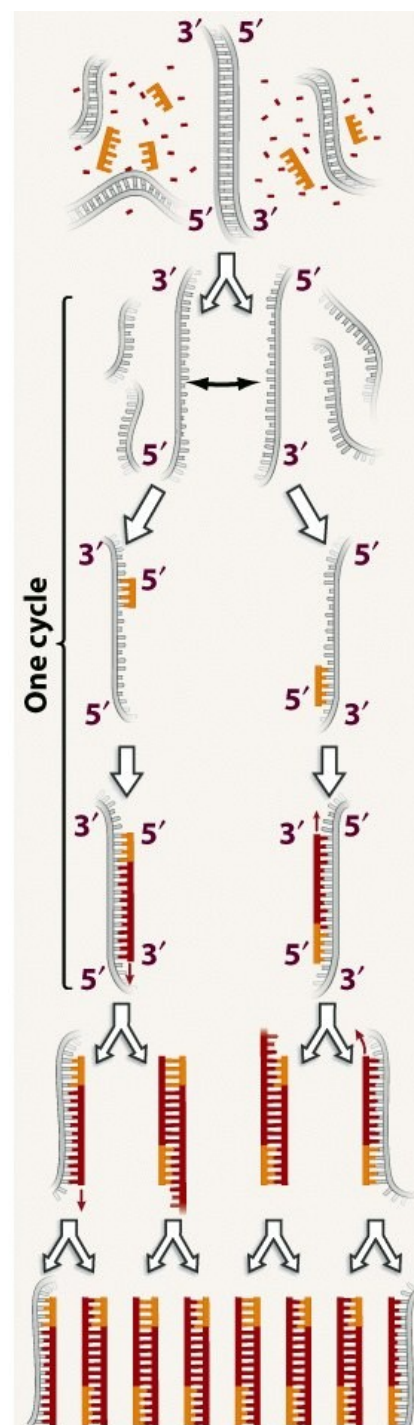
Reakce probíhá v přístroji zvaném termo-cykler, který velmi rychle střídá teploty.



30s 94°C

30s 55°C

30s 73°C



1. Start with a solution containing template DNA, synthesized primers, and an abundant supply of the four dNTPs.

2. Denaturation
Heating leads to denaturation of the double-stranded DNA.

3. Primer annealing
At cooler temperatures, the primers anneal to the template DNA by complementary base pairing.

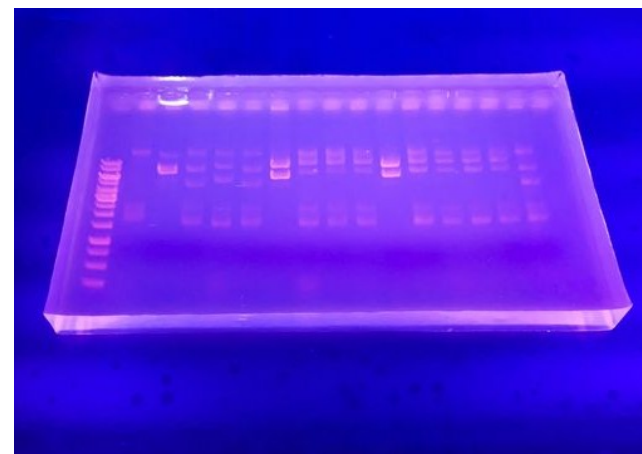
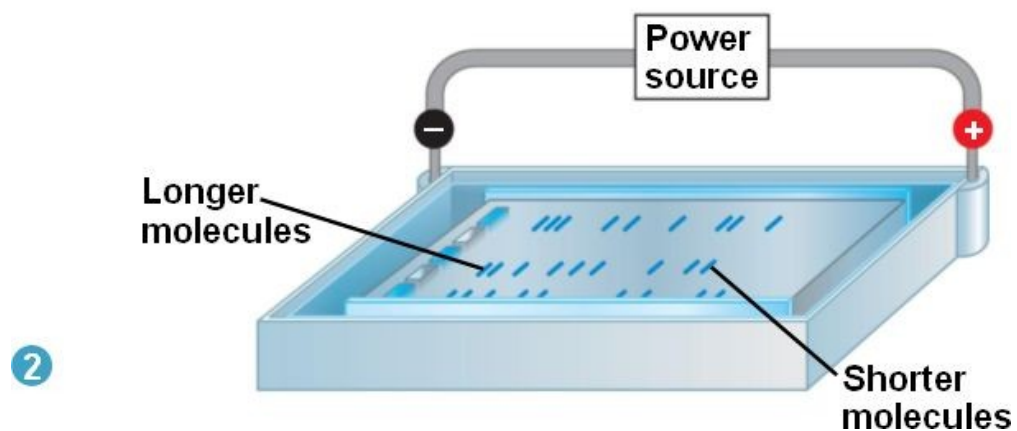
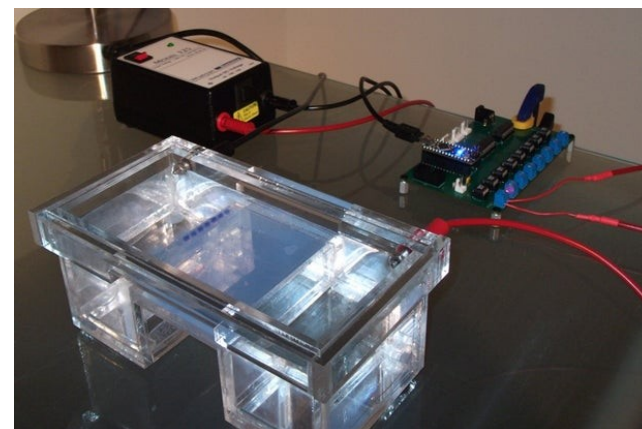
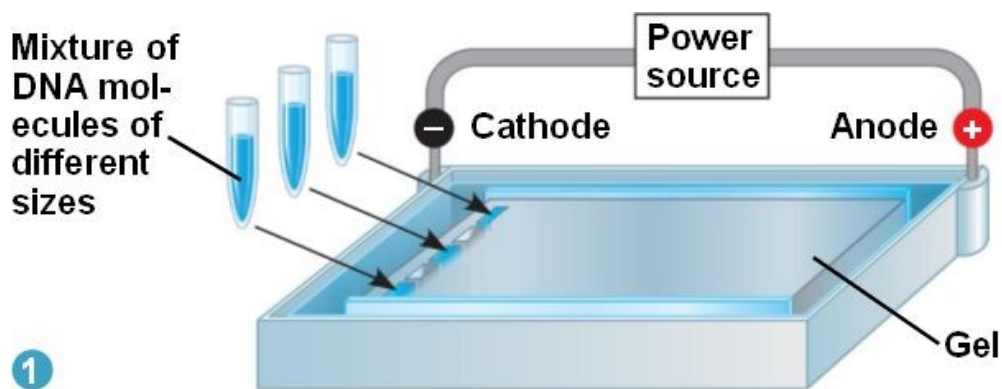
4. Extension
During incubation, DNA polymerase uses dNTPs to synthesize complementary DNA strand, starting at the primer.

5. Repeat cycle of three steps (2–4) again, doubling the copies of DNA.

6. Repeat cycle again, up to 20–30 times, to produce millions of copies of template DNA.

Gelová elektroforéza

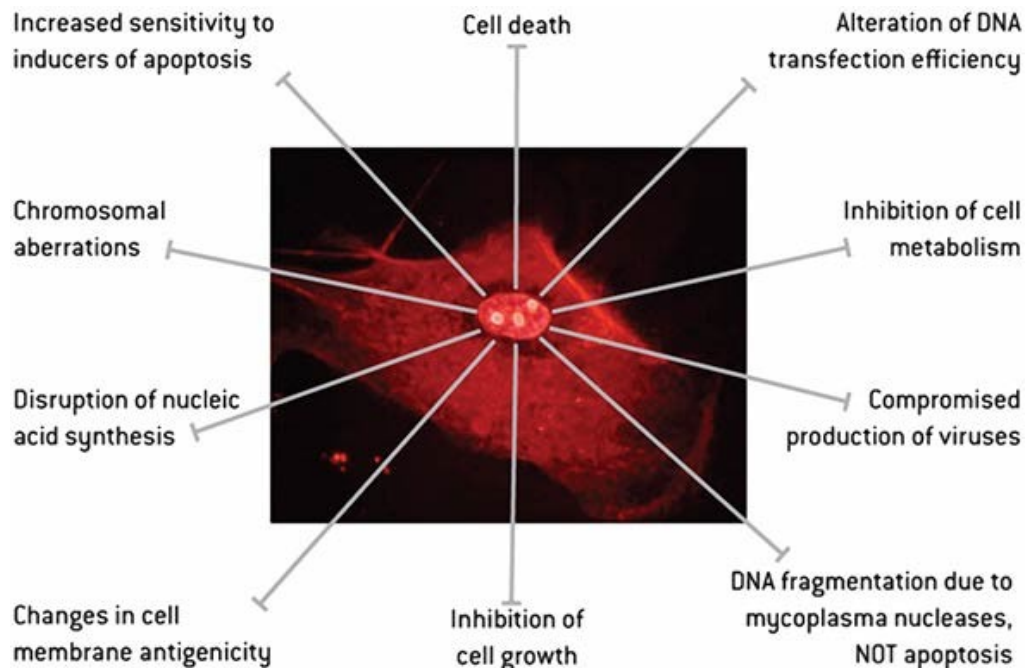
- velikost DNA (např. po PCR reakci) je ověřena na elektroforetickém gelu
- v elektrickém poli putují **záporně nabitě molekuly DNA** k anodě (+)
- gel je tvořen agarózou, kratší molekuly DNA v něm putují rychleji než delší
- pro vizualizaci fragmentů DNA je gel napuštěn ethidium bromidem, který se váže na DNA a po ozáření UV světlem svítí



PCR v laboratorní praxi

Detekce kontaminace buněčné kultury mykoplasmaty

5x Green buffer	10ul	
PCR Nucleotide mix (20mM)	0,5ul	(final 0,2mM)
F primer (100uM)	0,25ul	(final 0,5uM)
R primer (100uM)	0,25ul	(final 0,5uM)
Taq DNA polymeráza	0,25ul	(final 1,25U)
Templátová DNA	x ul	(final 100ng)
Doplnit vodou pro PCR na 50ul		



Cycler byl nastaven:

název programu – MYCOPLAS

„Calculated“

step 1: teplota a čas (iniciální 2min 94°C)

step 2: 0:30min 94°C - denaturace

step 3: 0:30min 55°C - annealing

step 4: 0:30min 73°C - extenze

step 5: GoTo step 35cycles

step 6: final extension 5min 73°C

step 7: 4°C forever (zadat čas 0)

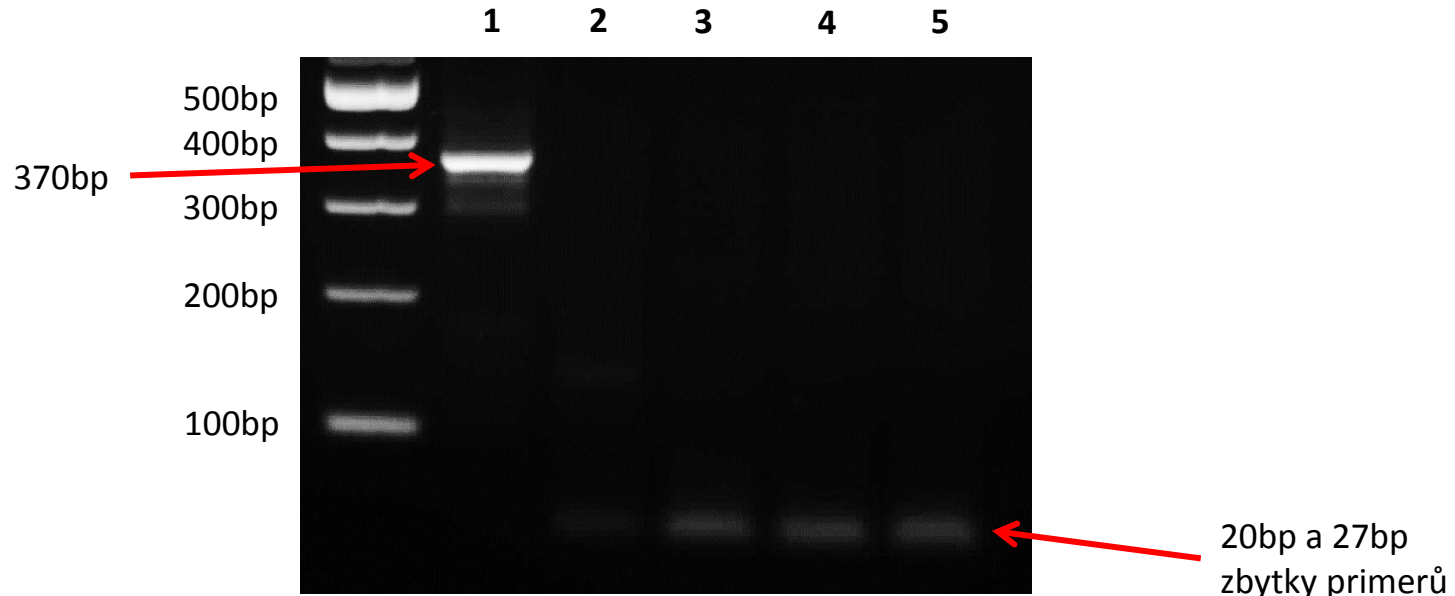
1 cyklus

Mycoplasma: nejmenší a nejjednodušší rod bakterií (cca 0,1 μm), nemají buněčnou stěnu (neúčinkují běžná ATB), často patogenní. V buněčných kulturách negativně ovlivňují růst buněk.

PCR v laboratorní praxi

Detekce kontaminace buněčné kultury mykoplasmaty

- PCR primery navrženy tak, aby nasedaly pouze na sekvence přítomné v DNA mykoplasmat
- PCR produkt vzniká pouze pokud je přítomna DNA mykoplasmat
- velikost produktu je 370 bp
- do gelu přidán EtBr (DNA interkalátor) - vizualizuje DNA pod UV lampou



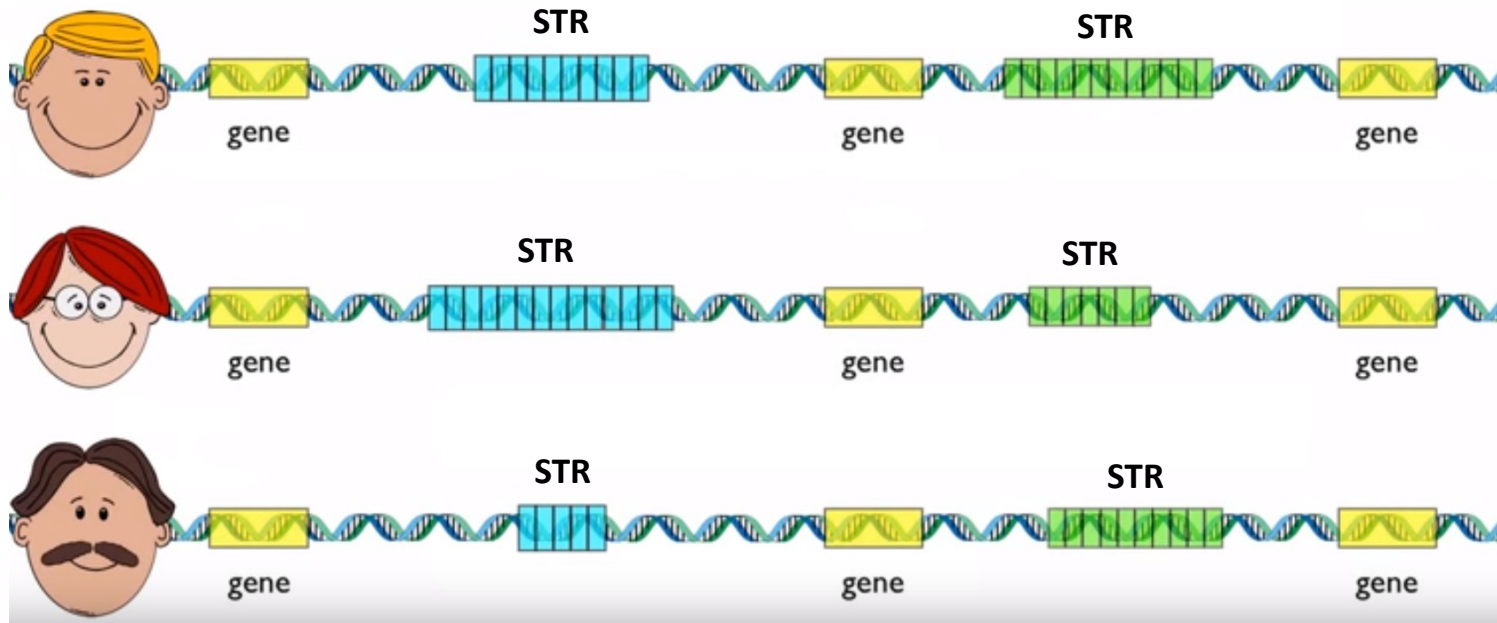
1. pozitivní kontrola - mykoplazmatická DNA
2. negativní kontrola - genomová DNA
3. vzorek č. 1
4. vzorek č. 2
5. vzorek č. 3

PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

- navrhnul Alex Jeffreys r. 1984
- sledují se nekódující regiony DNA zvané **Short Tandem Repeats (STR)**
 - krátké sekvence o 2-5 bazích opakující se 5-50×
 - každý člověk má unikátní sestavu (s výjimkou jednovaječných dvojčat)
- primery jsou navrženy před a za STR sekvencí
- DNA vyizolovaná z buněk je amplifikována pomocí PCR v regionech STR
- na elektroforetickém gelu se detekuje velikost fragmentu

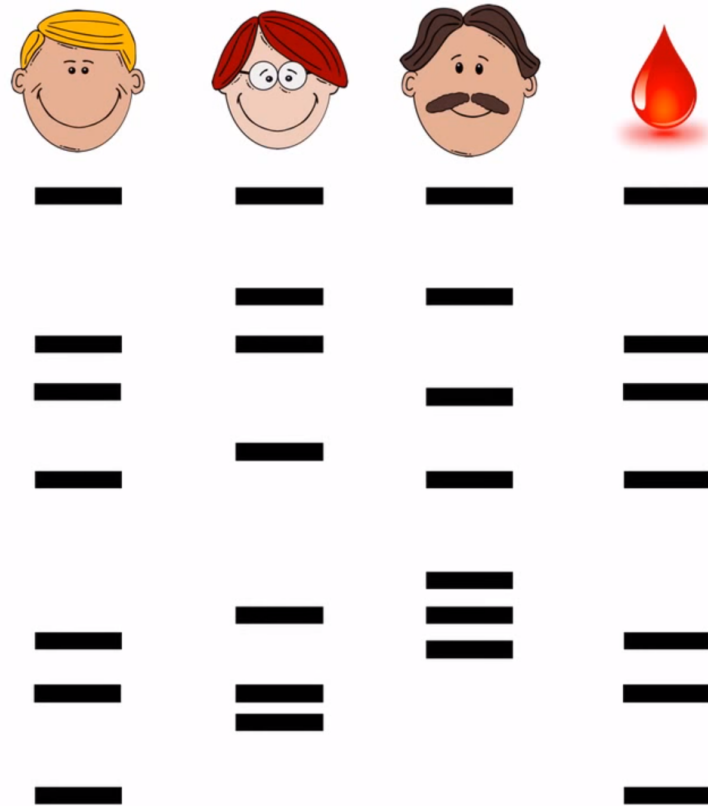


Alex Jeffreys



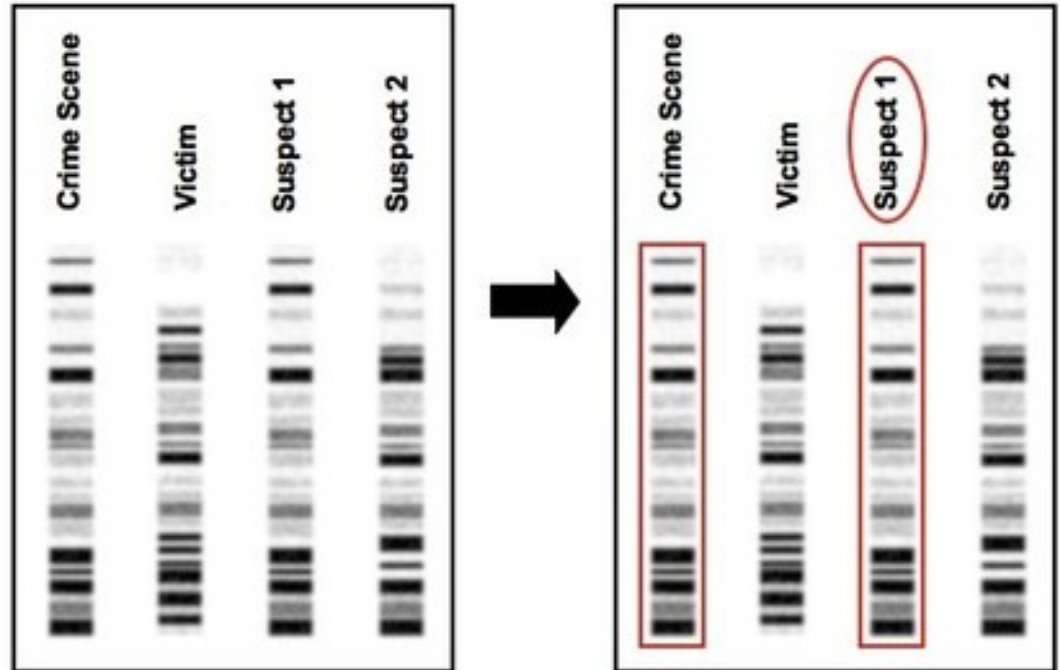
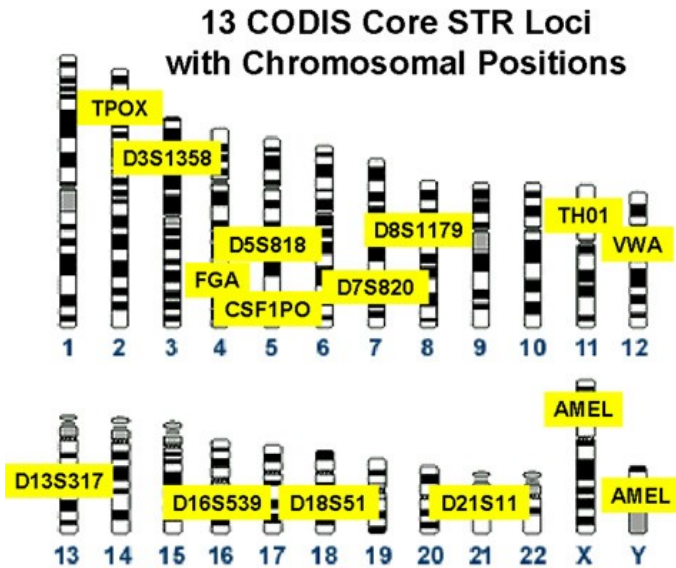
PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

- porovnání s DNA nalezenou na místě činu (z krve, tělních tekutin, kůže za nehty...)
- používají se STR s 4- nebo 5-nukleotidovými repeticemi



PCR v kriminalistice - DNA fingerprinting - STR

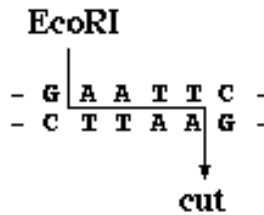
- FBI má databázi DNA zvanou CODIS (Combined DNA Index System)
- dle pravidel CODISu se testuje a uchovává **13 STR genetických markerů** na různých somatických chromozomech (2 alely - tzn. max 26 bandů) + **amelogenin** pro určení pohlaví
- AMEL: na chromozomu X obsahuje *intron 1* 6bp delecí, na rozdíl od Y (žena XX pouze 1 proužek 106; muž XY: proužky 106 a 112)



DNA fingerprinting - RFLP

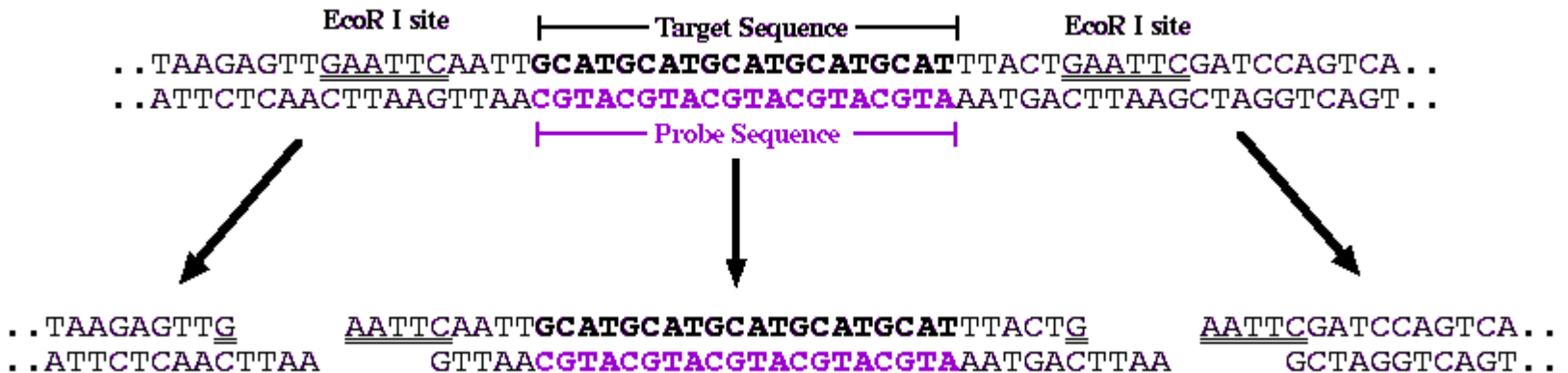
Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

- starší metoda pro testování identity na základě DNA
- restriční enzymy štěpí DNA ve specifických místech a vznikají různě dlouhé fragmenty DNA unikátní pro každého člověka



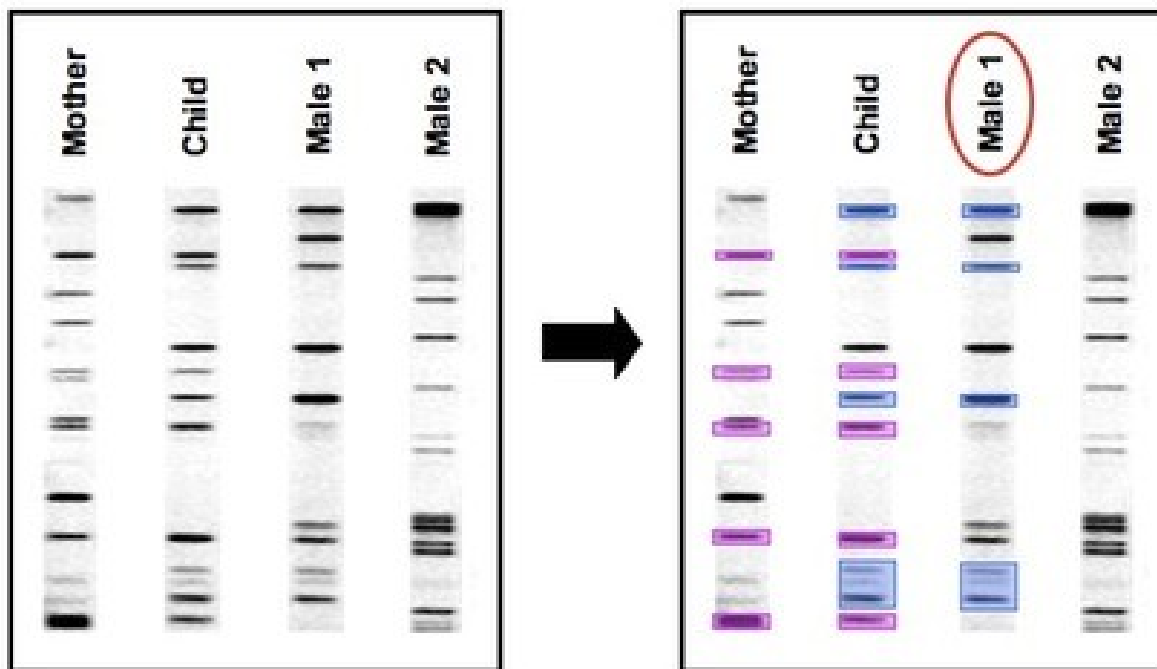
Nevýhody RFLP oproti STR

- pomalá, náročná a méně přesná metoda
- vyžaduje velké množství DNA



Testování otcovství

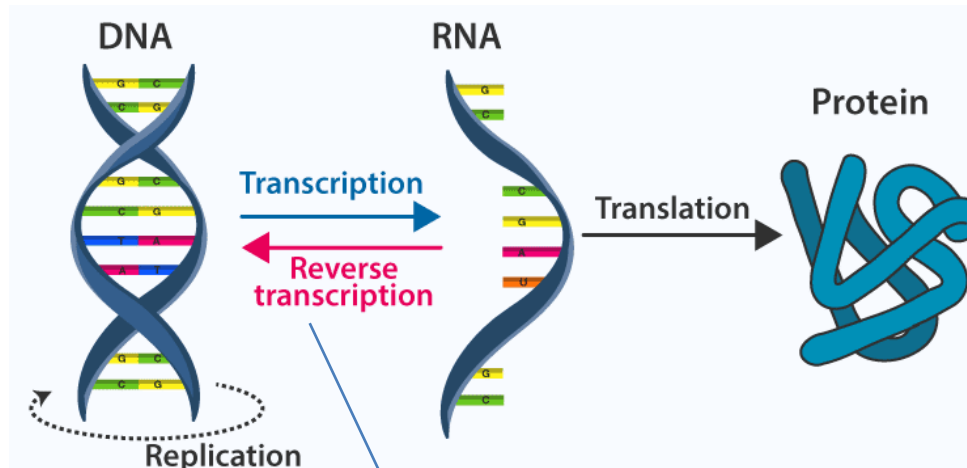
- dříve bylo používáno hlavně **vyloučení** otcovství na základě krevních skupin či dalších leukocytárních antigenů
- přesnější je testování DNA metodou **STR**
- typickým výsledkem je pravděpodobnost **100 % při vyloučení otcovství** a **99,99 % při potvrzení otcovství**
- každý proužek DNA dítěte musí odpovídat proužku na vzorku otce nebo matky nebo obou
- je zde zanedbatelná možnost unikátního fragmentu, který u dítěte vznikne v důsledku crossing-overu a/nebo mutace



Kvantifikace exprese genů

1. pro určení množství transkribované **mRNA** z určitého genu
 - a) **Real-time PCR**
 - b) **Microarrays**
2. pro určení množství vyrobeného **proteinu** určitého genu
 - a) **Western blotting**
 - b) **Flow cytometrie**

Centrální dogma molekulární biologie



při reverzní transkripci vzniká **cDNA**

1a) Real-time PCR (kvantitativní; qPCR)

Měření nárůstu nově syntetizované DNA po každém cyklu PCR.

Funkce: určit výchozí množství mRNA ve vzorku a tím sledovat genovou expresi

Postup:

1. izolujeme mRNA (pomocí kitu)
2. přepis mRNA do komplementární DNA (cDNA) pomocí enzymu reverzní transkriptázy
3. provedeme PCR podle principu popsaného výše, ale přidáme navíc fluorofor*
4. PCR reakci provedeme ve speciálním termo-cykleru s detektorem fluorescenčního záření
 - po každém cyklu přístroj zaznamená intenzitu fluorescence
 - vyšší intenzita = více DNA
 - přímé porovnání množství mRNA daného genu mezi vzorky
5. software vyhodnotí *relativní genovou expresi* (počet kopií mRNA)

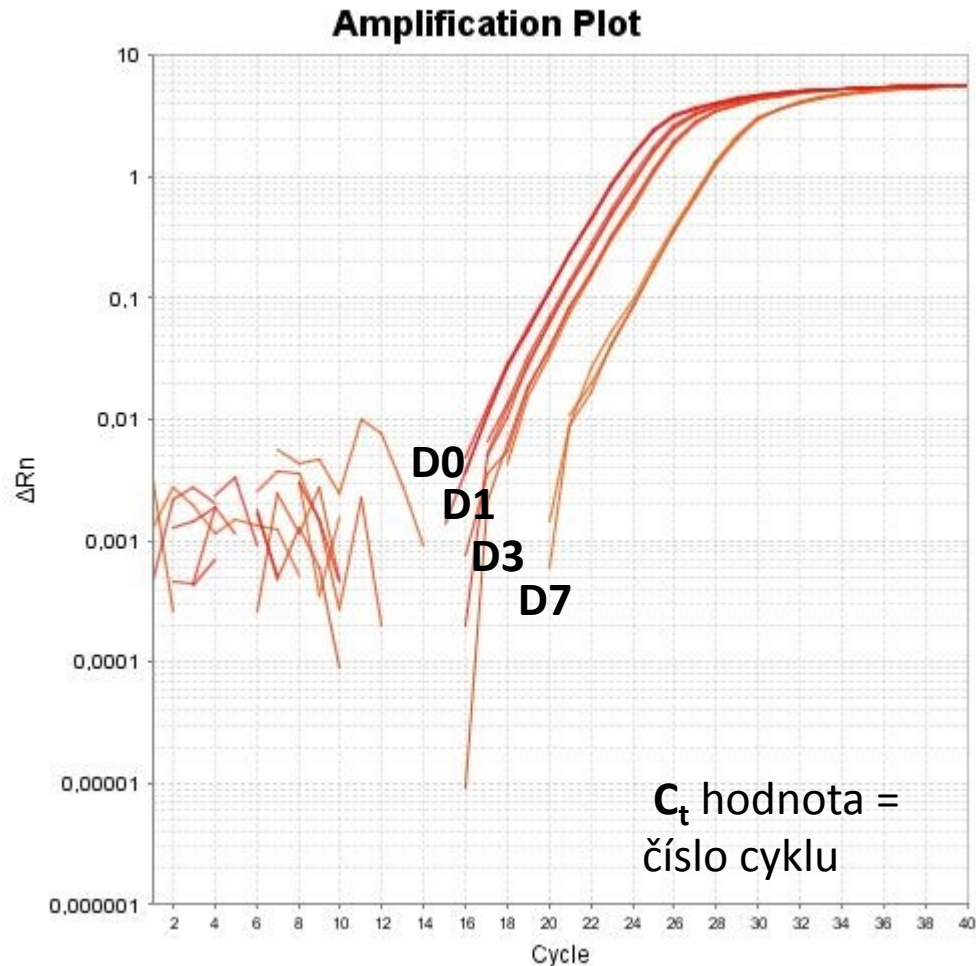


***Fluorofor (=fluorochrom):** molekula, která po osvětlení světlem určité vlnové délky absorbuje energii tohoto záření a prakticky okamžitě jí ztratí emisí záření o delší vlnové délce. Tomuto jevu se říká fluorescence. Fluoroforem může být malá molekula, typicky organická sloučenina s aromatickým jádrem, nebo i celý protein (např. GFP).

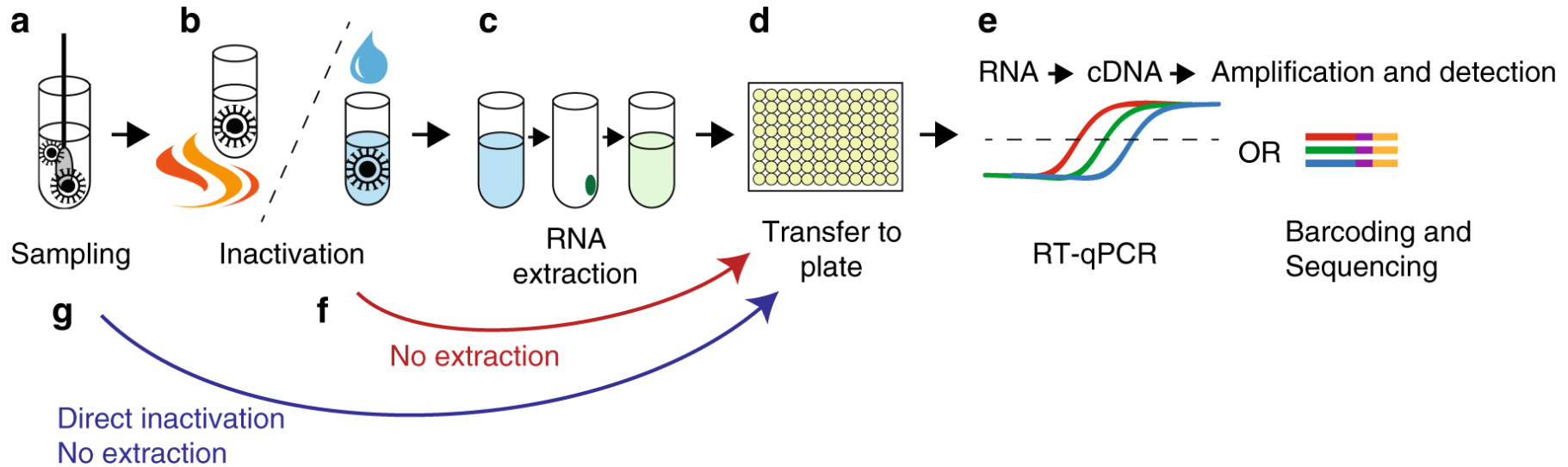
1a) Real-time PCR (kvantitativní; qPCR)

Vyhodnocení dat z qPCR

- 4 křivky v triplikátu
- pozdější nárůst = méně cDNA (menší exprese mRNA)
- *Příklad: Sledování poklesu exprese genu OCT3/4 v průběhu diferenciac embryonálních kmenových buněk. OCT3/4 je exprimován nejvíce v kmenových buňkách a u diferencovaných buněk je umlčen. D0 – den 0 až D7 – den 7.*



1a) Real-time PCR (kvantitativní; qPCR)



Postup pro testování COVID-19:

a Odběr materiálu od pacienta.

b Inaktivace viru detergentními činidly nebo zahřátím.

c Extrakce RNA.

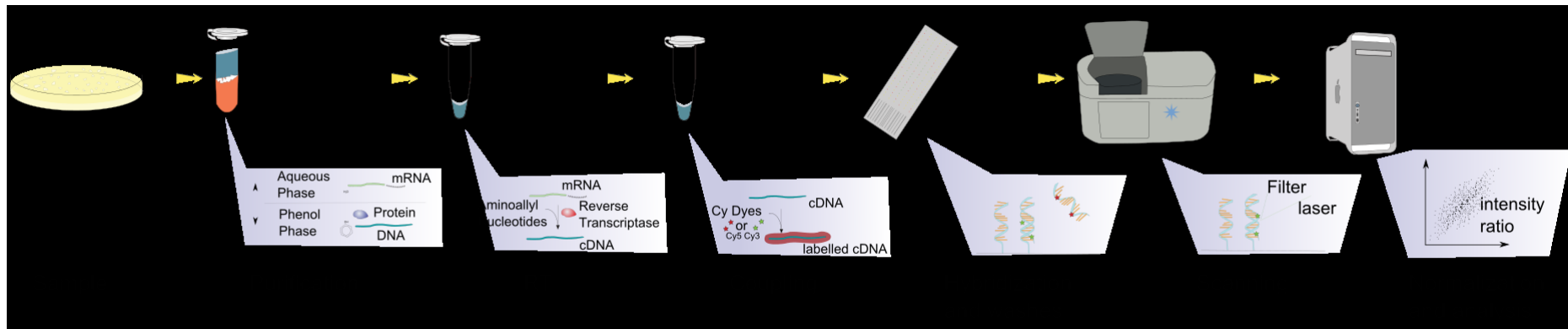
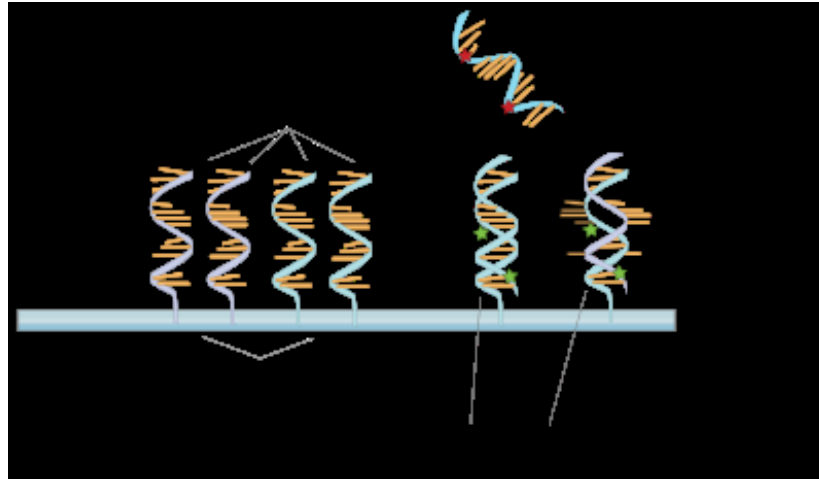
d Přenos na PCR destičku, ve které může proběhnout syntéza cDNA pomocí reverzní transkripce a následně qPCR.

e Detekce pomocí qPCR. Alternativně lze detekci provést pomocí čárového kódu vzorku a vysoce výkonného sekvenování DNA.

1b) Microarray

Mikroskopické spoty DNA fixované na pevném povrchu (chip, microarray).

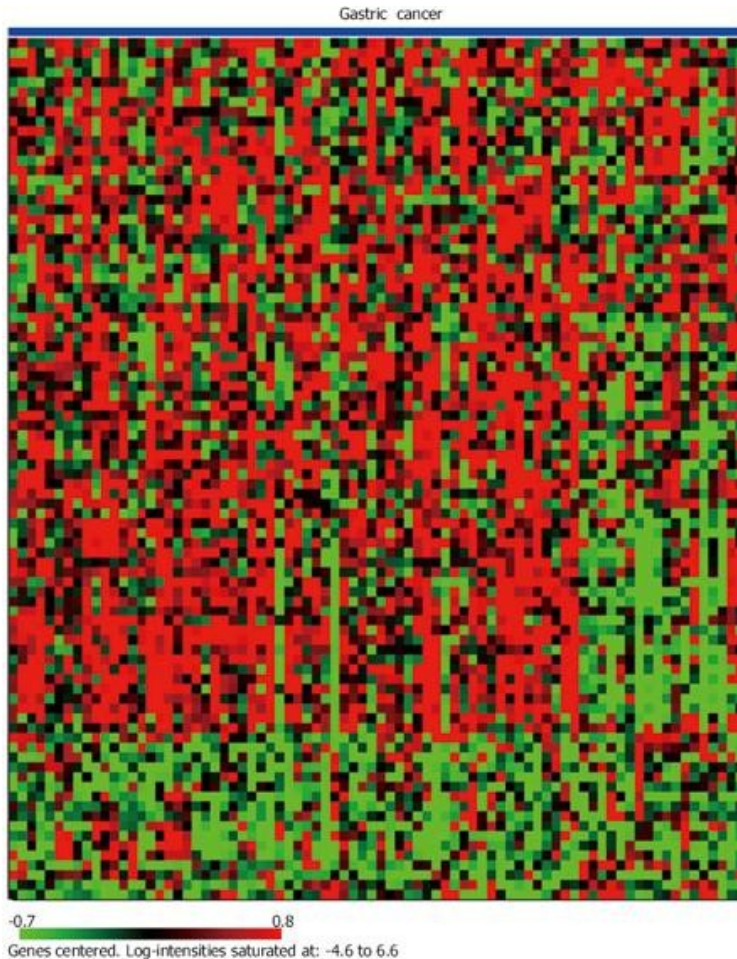
Funkce: zjištění míry genové exprese simultánně u obrovského množství genů
- každý spot (sonda, probe) je krátký úsek genu, který se hybridizuje s cDNA



1b) Microarray

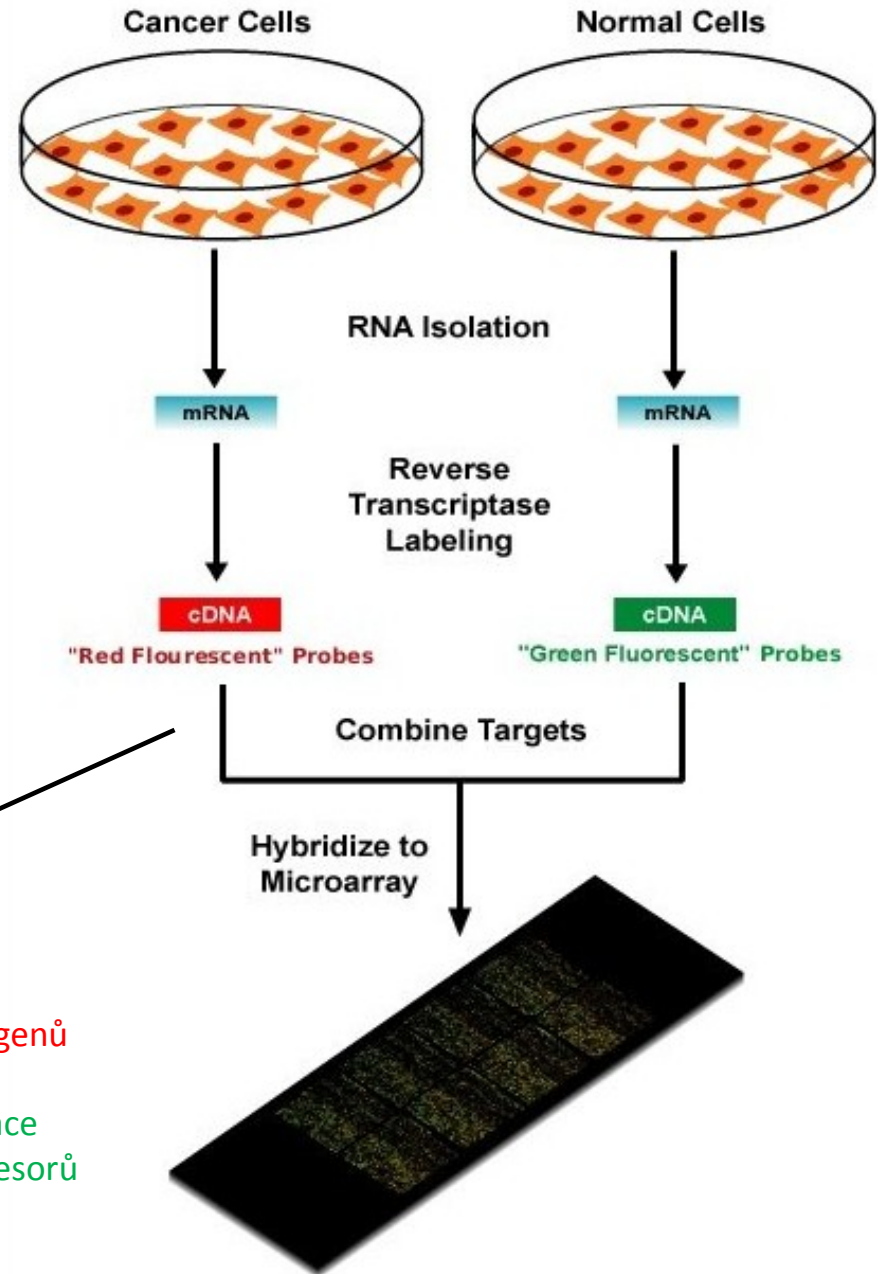
Srovnávají se mRNA dvou vzorků, např.:

- vzorek/referenční DNA
- zdravý/nemocný
- před/po léčbě



například:
upregulace
proto-onkogenu

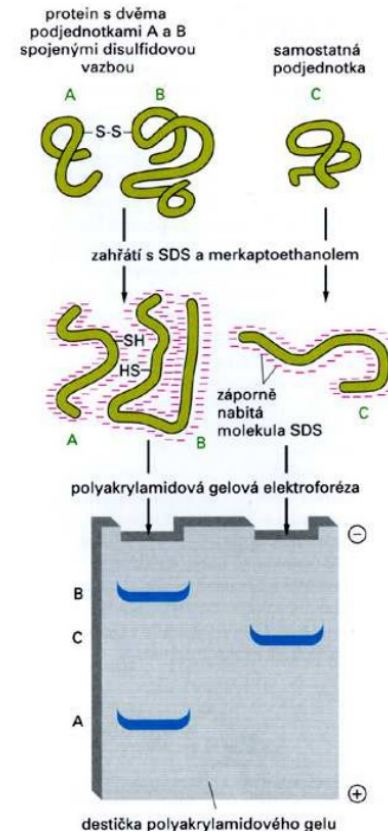
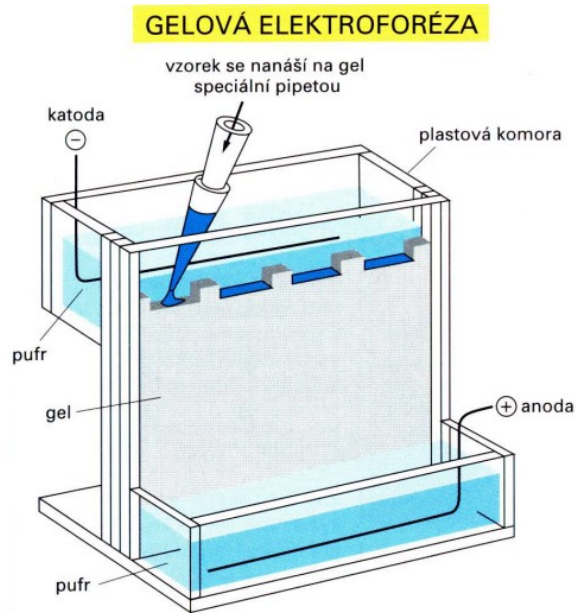
downregulace
tumor supresorů



2a) Western blotting

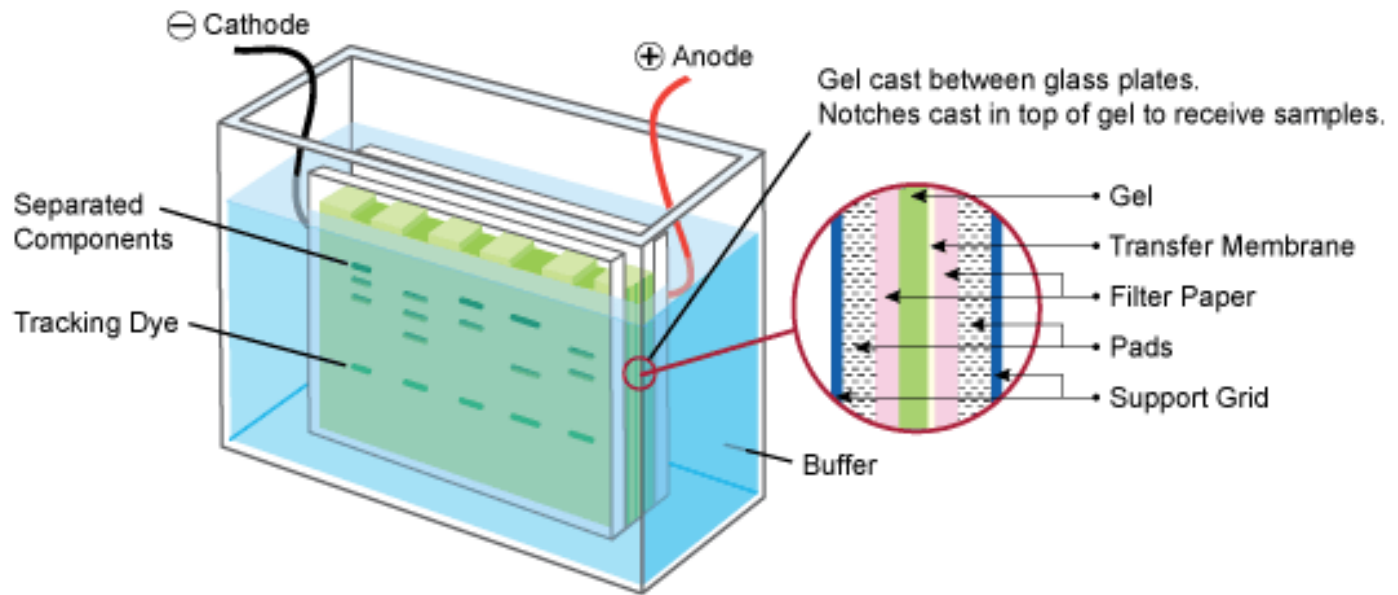
Určení množství určitého proteinu ve vzorku.

1. vyizolujeme celkový protein ze vzorků a změříme jeho koncentraci
2. zahřejeme s mercaptoethanolem a SDS pro **přidělení negativního náboje** a rozpojení disulfidických můstků
3. smícháme s obarveným nanášecím pufrem a naneseeme ve stejných koncentracích na **polyakrylamidový gel -> gelová elektroforéza**



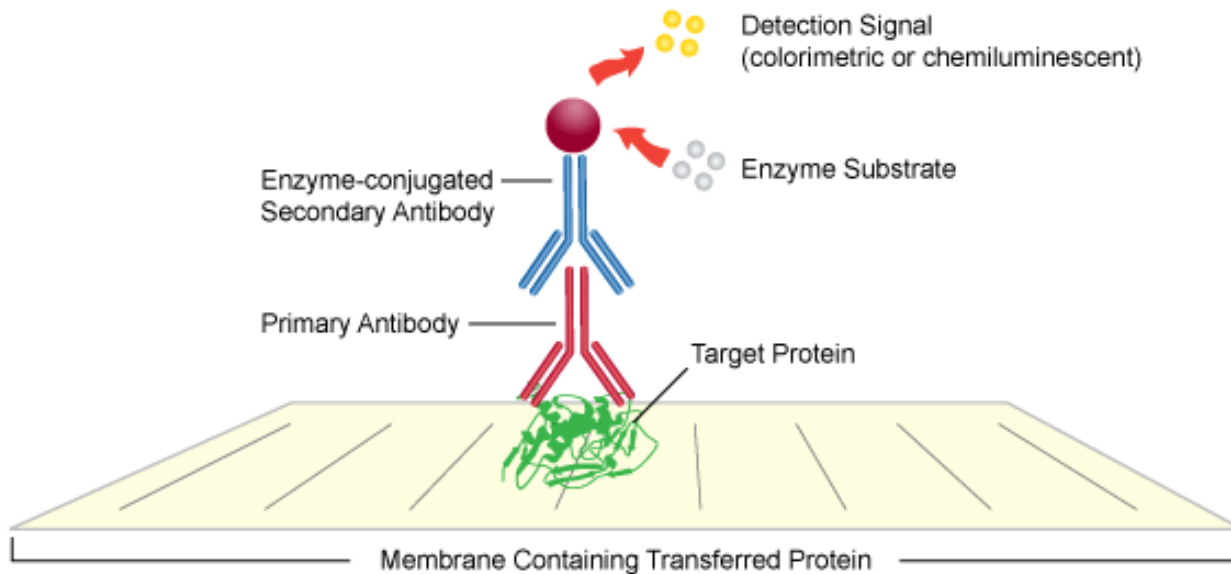
2a) Western blotting

4. přeneseme proteiny z gelu na **nitrocelulózovou membránu**



2a) Western blotting

5. inkubujeme membránu s **primární protilátkou** proti sledovanému proteinu
6. inkubujeme se **sekundární protilátkou konjugovanou s enzymem** (např. křenová peroxidáza; HRP)
7. nanese na membránu vyvolávací roztok se **substrátem pro daný enzym** (např. luminol)

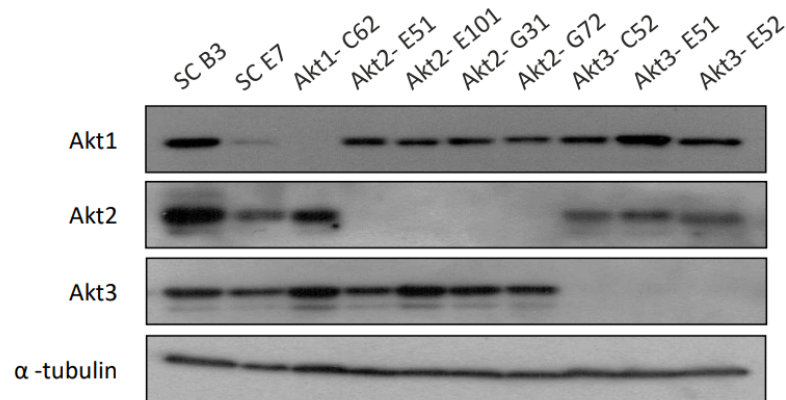


2a) Western blotting

8. vyvoláme membránu

- **HRP katalyzuje oxidaci luminolu** na 3-aminoftalát za emise světla
- nízká intenzita světla při 428 nm
- přítomnost dalších chemikálií (fenoly) ve vyvolávacím roztoku amplifikuje světlo až 1000×
- tato amplifikace se nazývá "enhanced chemiluminescence - ECL"

- detekce pomocí **CCD kamery**
- vyvolání na **fotografický film**



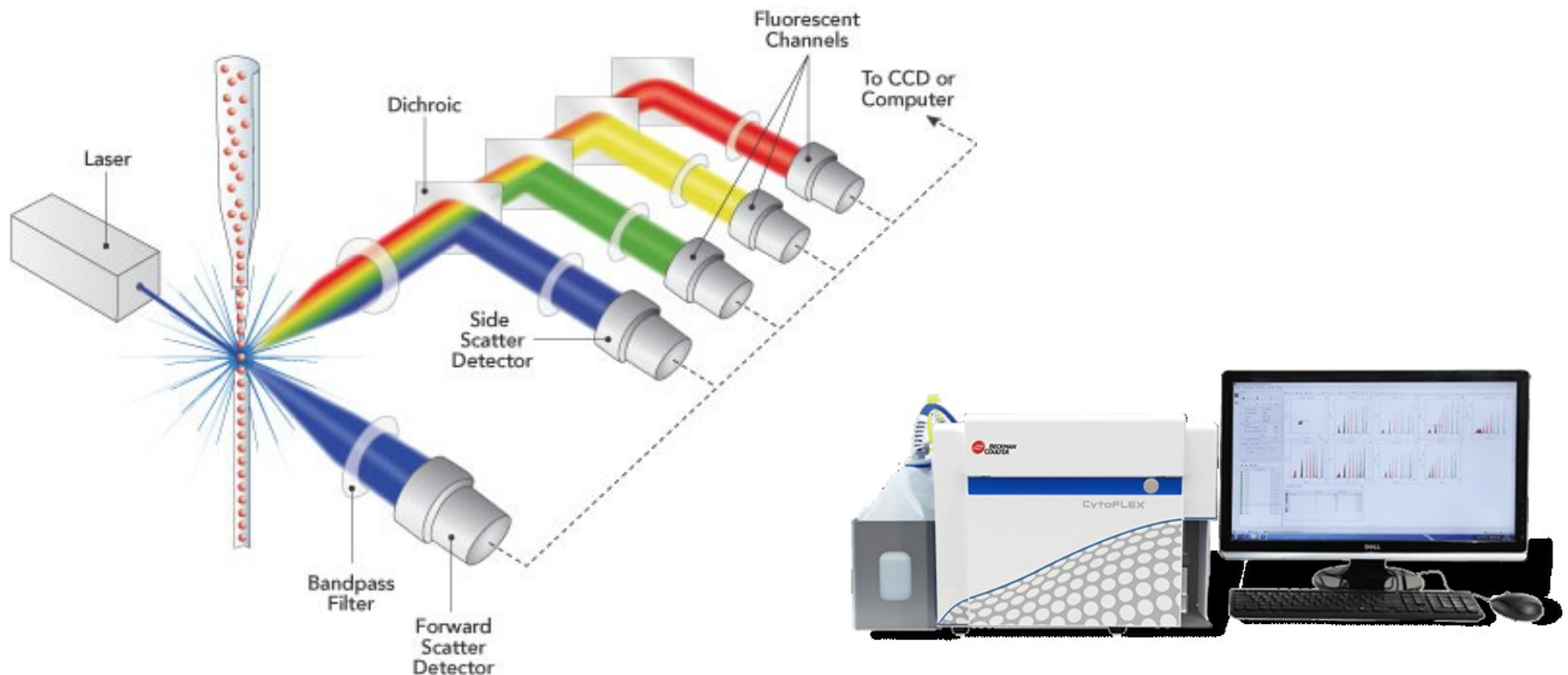
Obrázek 12: Genetická inaktivace izoform kinázy Akt u klonů Akt-. Pomocí metody CRISPR/Cas9 byla vytvořena mutace, která znemožňuje expresi izoform kinázy Akt. Buňky klonů Akt- a klonů SC byly kultivovány v prostředí normoxie po dobu 3 dnů. Hladina jednotlivých izoform kinázy Akt byla stanovena v buněčných lyzátech metodou imunoblotu s využitím specifických protilátek. Analýza stejného množství analyzovaných proteinů v jednotlivých vzorcích byla potvrzena pomocí protilátky specifické vůči α-tubulinu.

2b) Flow cytometrie

Technika pro analýzu vlastností individuálních buněk v buněčné populaci.

Na buňkách je možné rozlišit

- **velikost** (forward scatter)
- **tvar/granularitu** (side scatter)
- expresi **povrchových proteinů** (protilátka proti povrchovým antigenům konjugovaná s fluorochromem)
- expresi **intracelulárních proteinů** (buňky nutno zafixovat a permeabilizovat membránu)



2b) Flow cytometrie

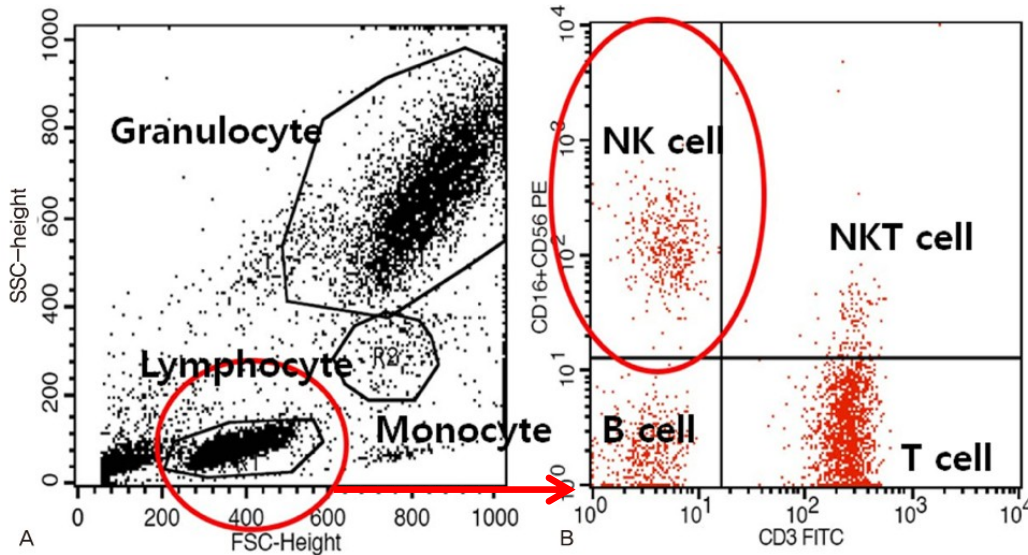
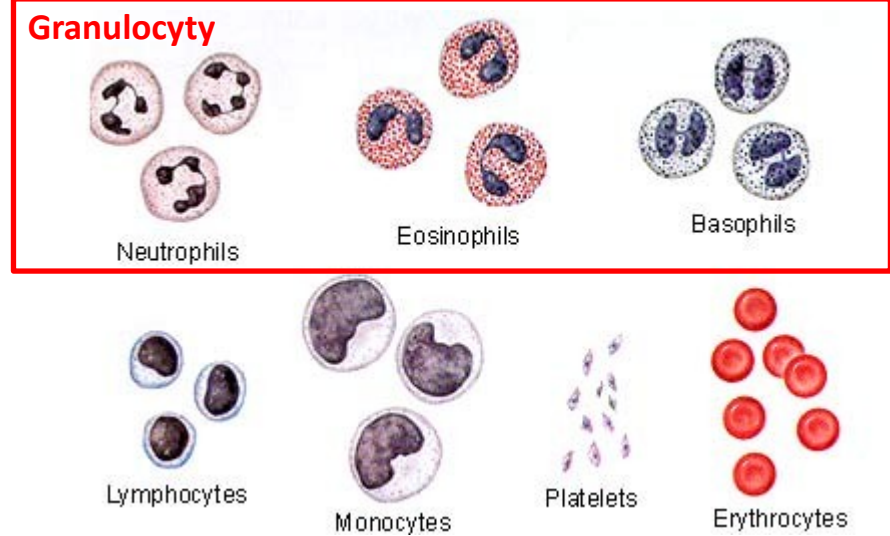
Vyhodnocení:

Leukocyty - bílé krvinky hledání NK buněk

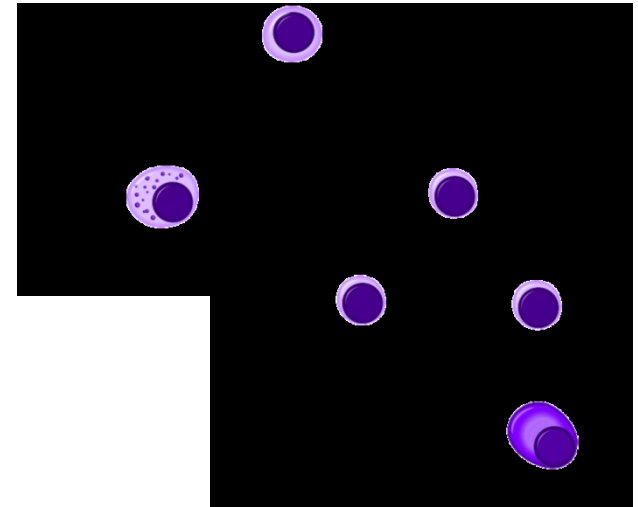
CD3 - T cell receptor

CD16 - povrchový antigen na NK buňkách,
neutrofilech, monocitech a makrofázích

CD56 - povrchový antigen NK buněk



R1 (lymphocyte) gating → CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺ (upper right) part reading

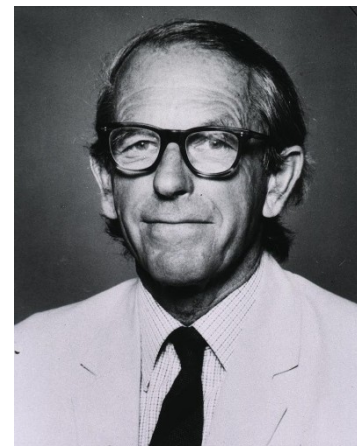


NK cells - imunitní odpověď proti rakovinným buňkám a buňkám infikovaným virem
Granulocyty - přítomnost granulí v cytoplazmě a zaškrzení jádra

Frederick Sanger (1918 - 2013)

Vynálezce metody dideoxy sekvenování DNA (též Sangerovo sekvenování).

- dvojnásobný držitel Nobelovy ceny za chemii (1958 a 1980)
 - 1952 definoval pořadí aminokyselin ve dvou řetězcích bovinního inzulínu
 - 1977 publikoval dideoxy metodu pro rychlé a přesné sekvenování



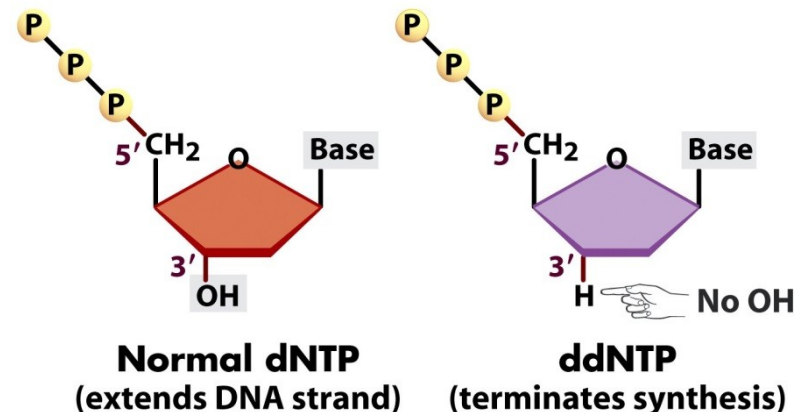
Frederick Sanger

Sangerovo sekvenování = sekvenování 1. generace

Sekvenování je určování pořadí nukleotidů v molekule DNA.

- principem je použití dideoxyribonukleosid trifosfátu (**ddNTP**) namísto deoxyribonukleosid trifosfátu (**dNTP**)
- při replikaci se normálně připojuje nový dNTP na OH-skupinu posledního dNTP na 3'-konci řetězce
- pokud se připojí ddNTP - elongace končí

ddNTPs terminate DNA synthesis.



Sangerovo sekvenování = sekvenování 1. generace

- smícháme templátovou DNA + DNA polymerázu + dNTP (T, A, C, G) + 1 ddNTP (např. G) + radioaktivně značený primer → elongace řetězce se zastaví na místech zabudování ddGTP
- vznikají nám různě dlouhé řetězce DNA

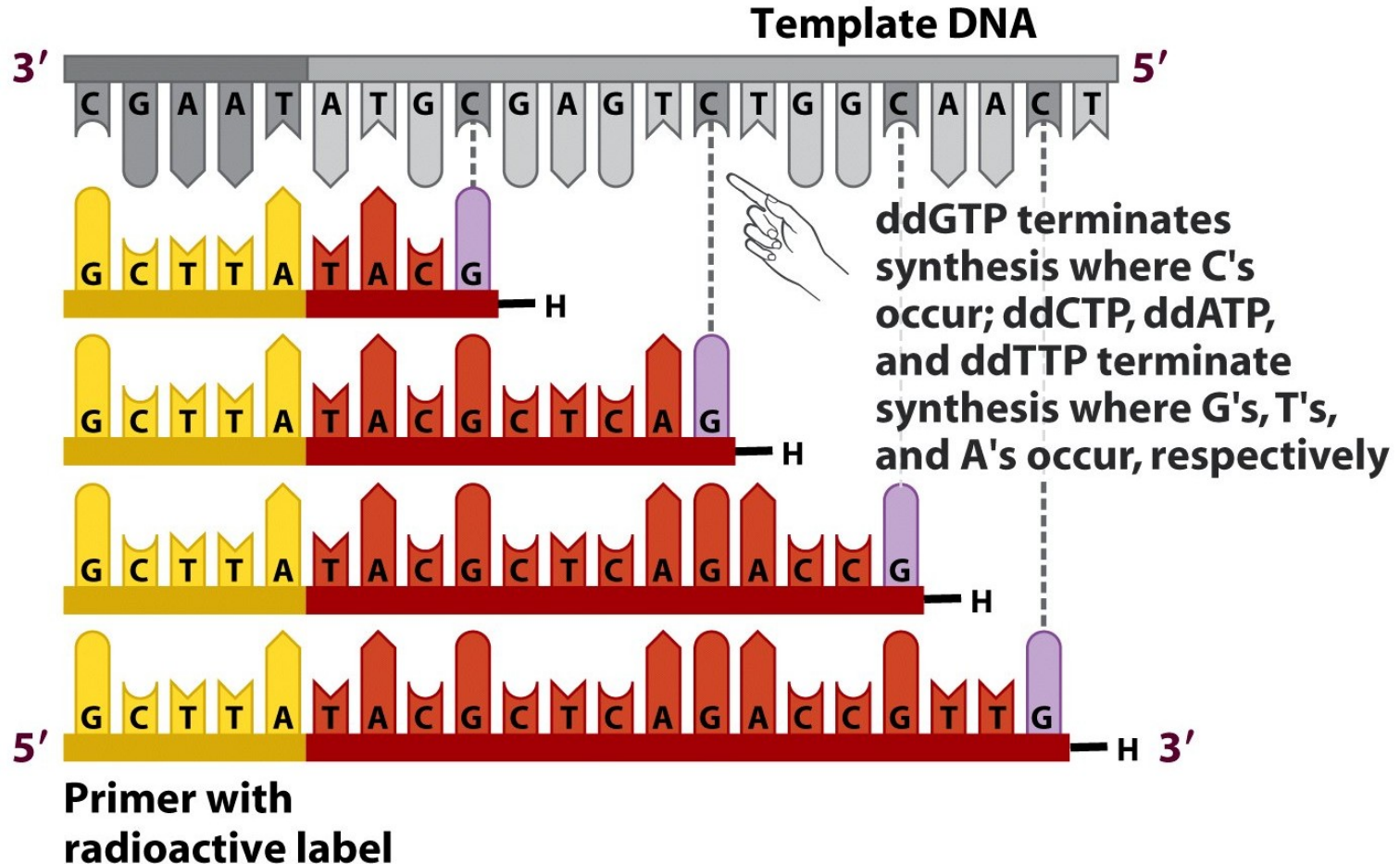


Figure 19-6b Biological Science, 2/e

© 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

Sangerovo sekvenování = sekvenování 1. generace

- reakci provedeme 4×, pro každý dideoxyribonukleosid zvlášť (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP)
- produkty těchto 4 reakcí nanese do 4 jamek elektroforetického gelu a roztrídíme podle délky
- sekvence DNA je jasná z gelu

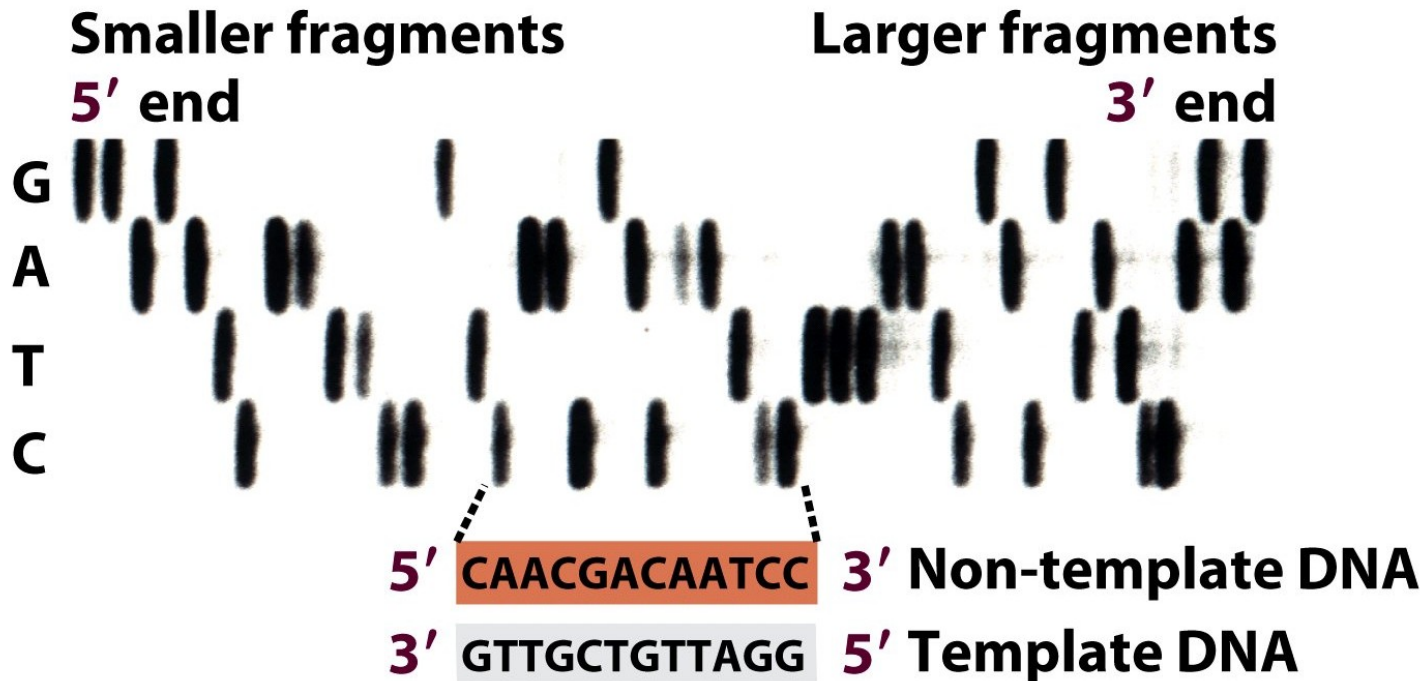


Figure 19-6c Biological Science, 2/e

Modernizace Sangerova sekvenování = sekvenování 1. generace

- ddNTP jsou značeny fluorescenčně, každý jinou fluoroforem a proto lze všechny 4 ddNTP smíchat do jedné reakce
- fragmenty jsou separovány v kapilárách naplněných gelem
- automatické zaznamenávání délky jednotlivých fragmentů

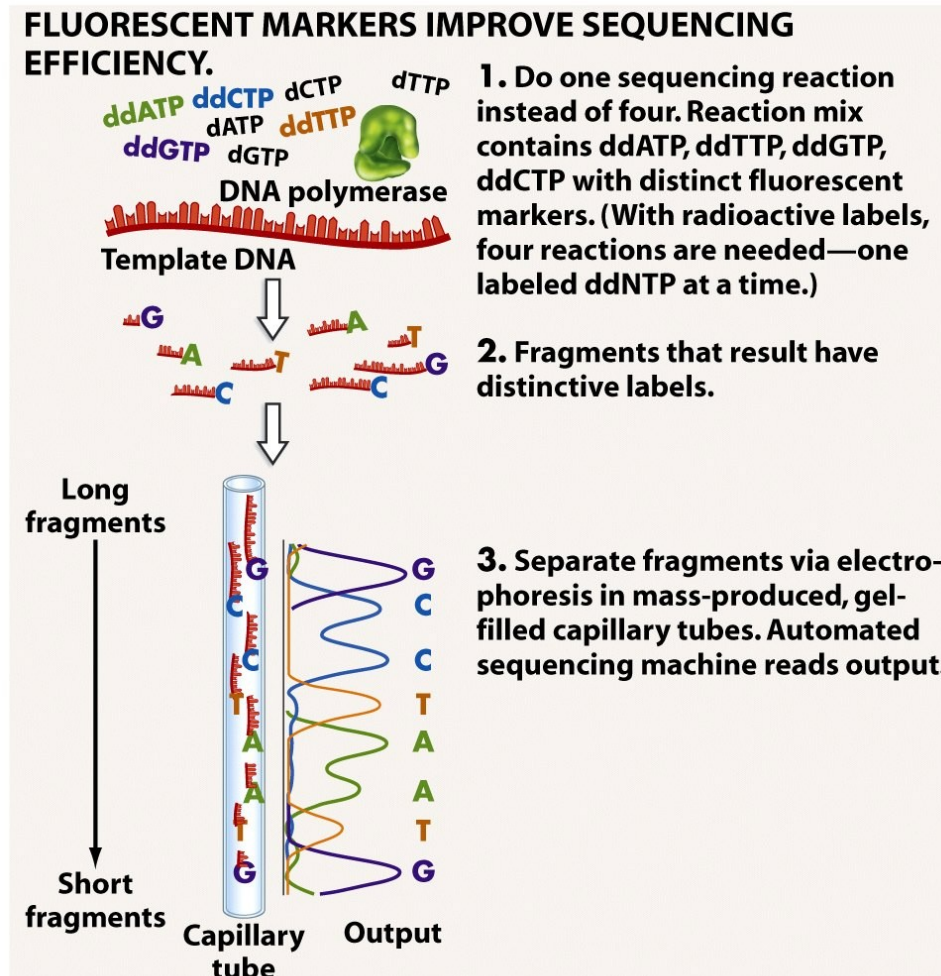
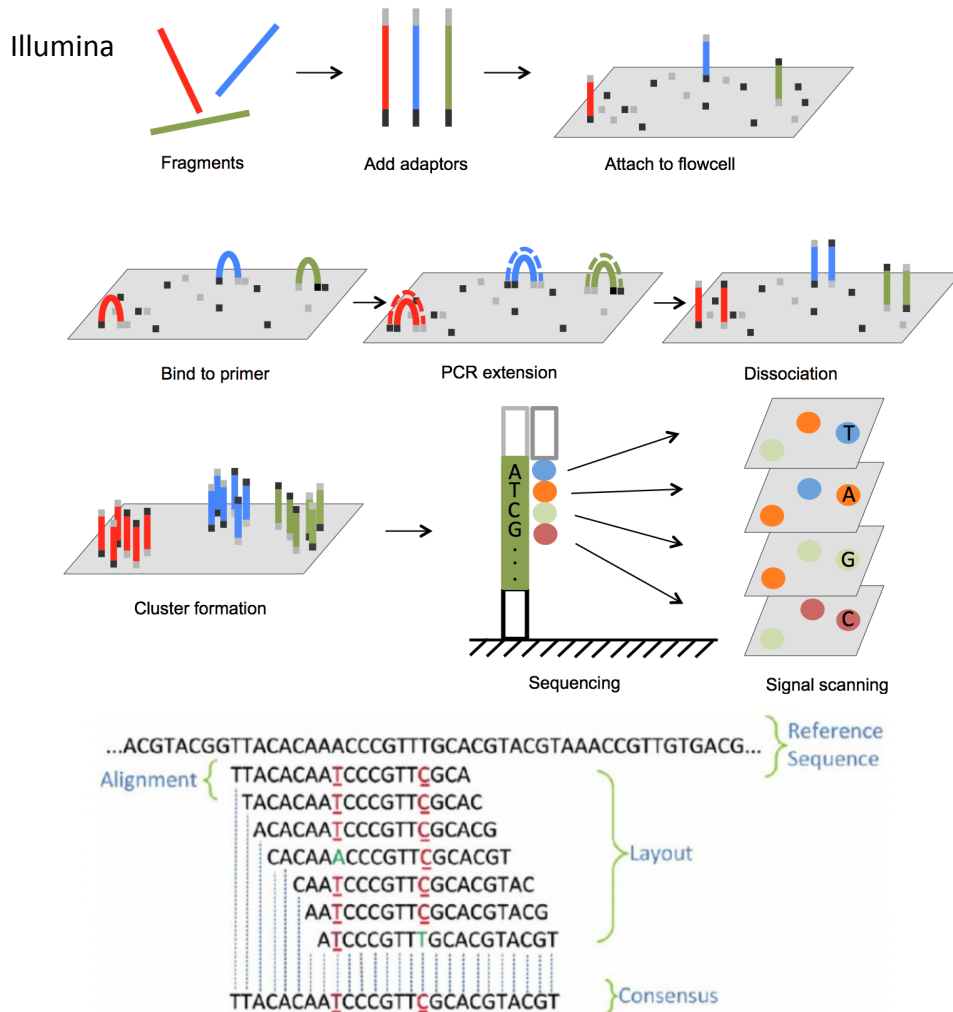


Figure 20-1 Biological Science, 2/e

Sekvenování nové generace = Next generation sequencing (NGS) = sekvenování 2. generace

- paralelizace procesu sekvenování, kdy dochází k sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně
- výsledkem je obrovská produkce výstupních dat s následnou potřebou data utřídit a analyzovat
- rychlá a cenově příznivá produkce velkého množství osekvenovaných vzorků najednou

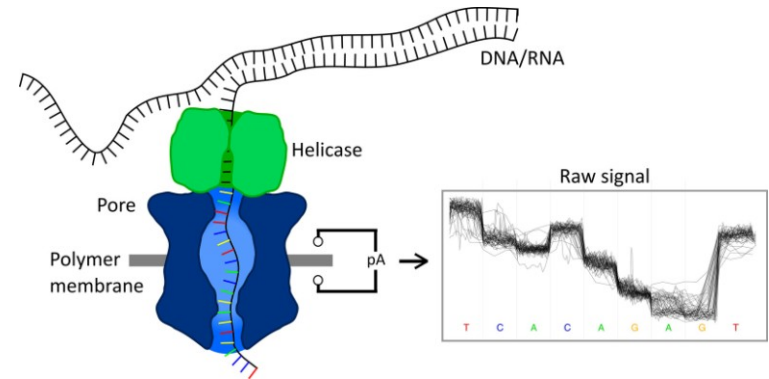


- templátová **DNA fragmentována** na úseky několika set bází dlouhé
- konce získaných fragmentů jsou enzymatickou reakcí zatupeny a napojeny k oligonukleotidům určité sekvence - tzv. **adaptéry**
- jednotlivé fragmenty jsou **odděleně amplifikovány PCR reakcí** (u některých technologií tento krok chybí) a pak v jednom kroku paralelně sekvenovány (až milióny sekvencí najednou)
- délka získaných sekvencí je cca **50-500 bp**
- sekvenační výtěžek jednoho běhu sekvenátoru může být **až několik tisíc Gb**

Sekvenování 3. generace

- sekvenace jediné molekuly DNA bez nutnosti paralelních sekvenačních procesů či předchozí amplifikace DNA
- sekvenace v reálném čase
- produkuje výrazně delší čtení (řádově tisíce až desetitisíce bp)
- snazší sestavování (assembly) jednotlivých čtení
- snazší sekvenování GC bohatých oblastí (druhá generace – problémy)

Oxford Nanopore



– průchod vlákna DNA miniaturním pórem, kterým prochází elektrický proud; při průchodu dochází ke kolísání proudu specifickým způsobem odpovídajícím procházejícímu nukleotidu

First generation

Second generation
(next generation sequencing)

Third generation



Sanger sequencing
Maxam and Gilbert
Sanger chain termination

Infer nucleotide identity using dNTPs,
then visualize with electrophoresis

500–1,000 bp fragments



454, Solexa,
Ion Torrent,
Illumina

High throughput from the
parallelization of sequencing reactions

~50–500 bp fragments



PacBio
Oxford Nanopore

Sequence native DNA in real time
with single-molecule resolution

Tens of kb fragments, on average

Short-read sequencing

Long-read sequencing

CGGCCGGGATATTCTTATTTCTGCGTATTG
AGAGGGGGCGTAAATTGGAGGTCATTCCCACAC
AGGACGGGTACTAGACTCGCCATGAACGGCAAG
AATGGTAGTGATAAATACTCCTGGCCGGCTTTGCC
ATGTTAACCCCAACACCTAAGTTATTCTGGTTACCAAC
GGGCACATAAGTTCTCTTGGCTTCCCAGAAATACCCCAAC
AGATTCTGGTGTTCACTCCGAGATAAGANTCATA
CGGTAATTTGCGGACGGTTCATGACTACGTT
CGTGCCTTGATACCGCCCTGGGTGTECG
GTACCCTTCACATACTCTGGAGAGAG
GCCAGAGTGATCCCAACATAATTTG
AGAGGAATTAATGAGAGGATCTG
TTTGTCTGTTCTGACATTAATG
TGCCGCAAGTTCTGCTCTGGC
GATAATAGTATGTTAATCG
TCTTGCAGTTCTC
TATCCAAGC