

# **Genetika v zubním lékařství – cvičení 2**

## **Metody molekulární biologie**

# Biologický materiál

- Biologický materiál je vše, co bylo či je součástí nebo produktem živého organismu.
  - sušená bylinná čajová směs
  - ohryzek od jablka
  - dubové prkno
  - kočičí trus/srst
  - zkumavka s virem SARS-CoV-2
  - tělní tekutiny – moč, krev, plazma, sérum, sliny, ejakulát, hlen
  - tkáně, buňky

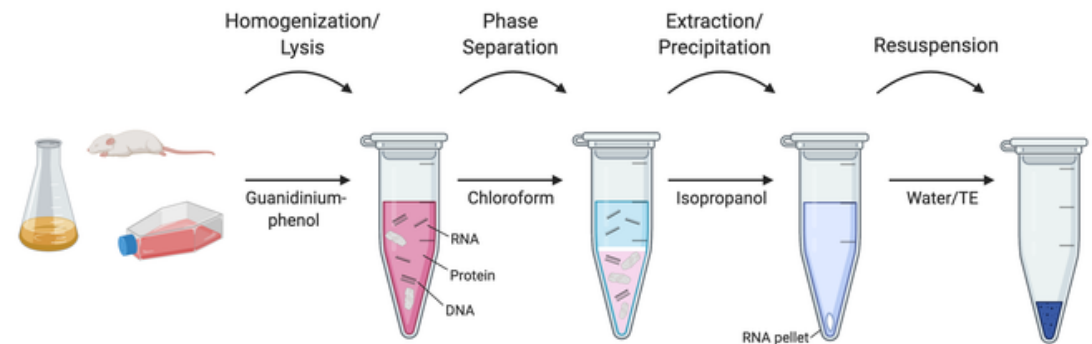


# Izolace nukleových kyselin

- V nativním stavu z přirozeného materiálu – v dostatečném množství a požadované čistotě.
- NK je potřeba zbavit všech všech látek, které se po lyzi buněk stávají součástí hrubého lyzátu a jejichž přítomnost by bránila účinnému specifickému působení enzymů používaných k dalším analýzám.



- Izolace genomové DNA
- Izolace RNA – důraz na ochranu před degradací!



# PCR – Polymerase Chain Reaction

- **Cíl** – získání požadované a specifické sekvence genomové DNA bez jejího předchozího klonování
- **Princip** – mnohonásobná replikace
  - 25 až 35 cyklů
  - závislost na teplotě reakční směsi
  - množství namnožené DNA roste exponenciální řadou ( $2^n$ )
- Termocycler



## PCR Protocol

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result

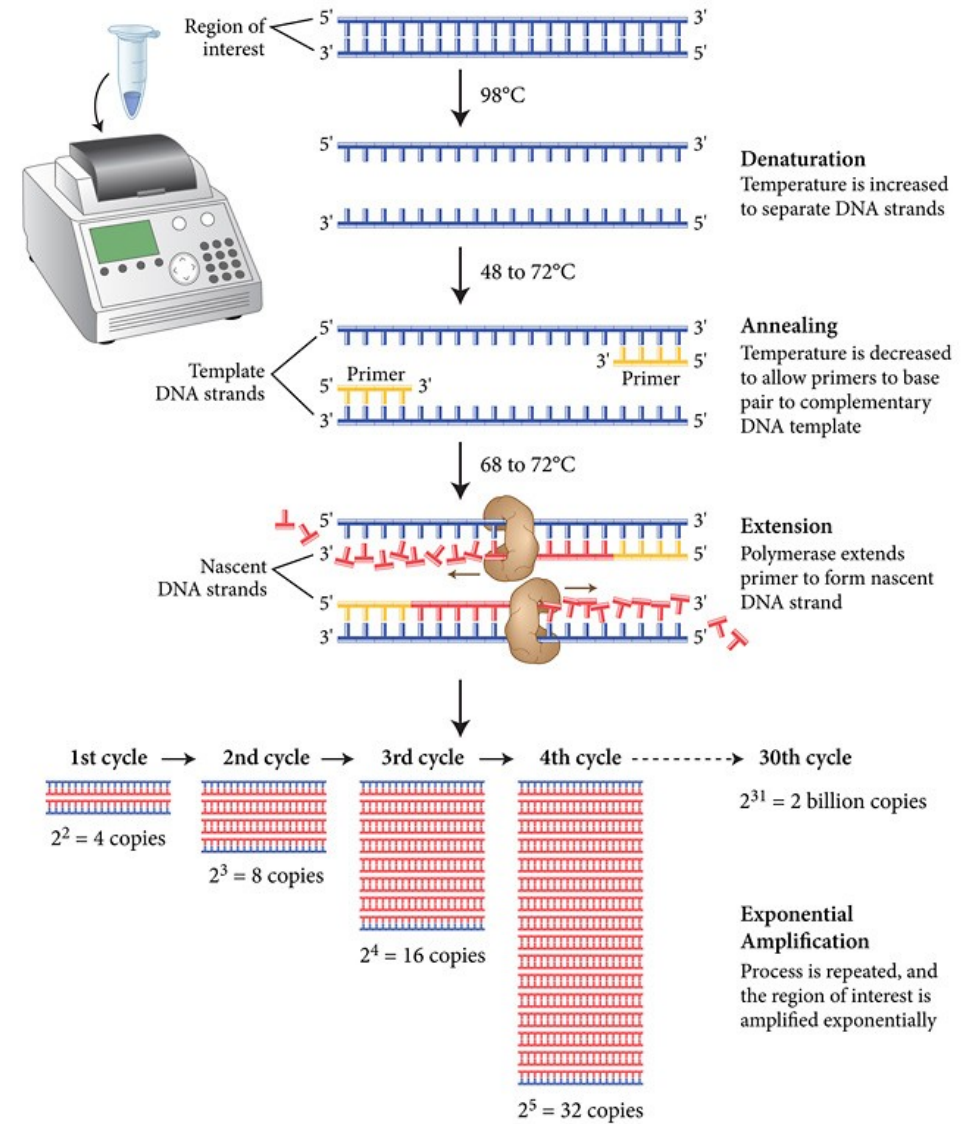
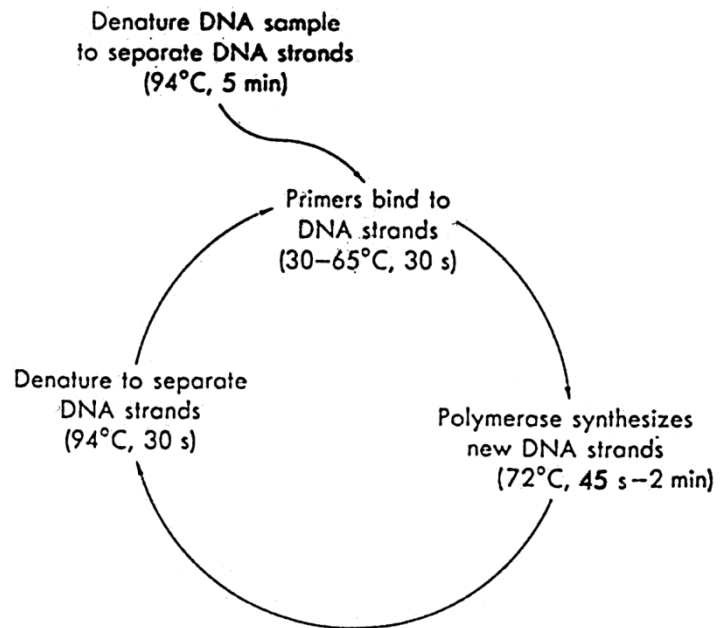


Cry



# PCR

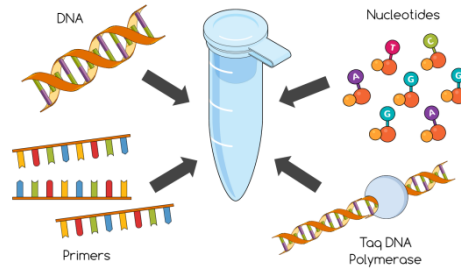
- **Mnohonásobná *in vitro* replikace ve zkumavce**
- Řetězová reakce vycházející z DNA replikace
- Opakování cyklů:
  - denaturace (separace dsDNA) – 96 °C
  - annealing – navázání primerů – 50–65 °C
  - elongace – syntéza nového vlákna DNA – 72 °C



# PCR

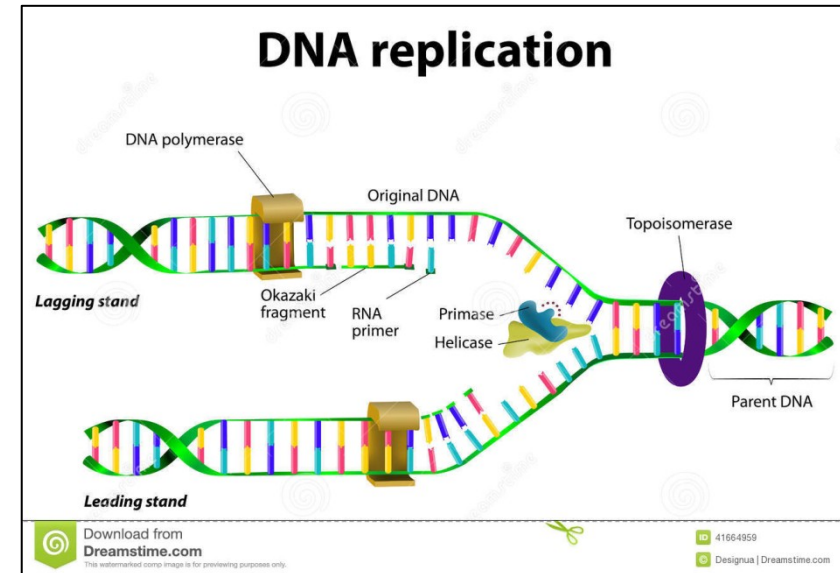
- **DNA replikace – *in vitro* (PCR)**

- **templátová DNA**
- **dNTP**
- **pufr (pH=8)**
- **Mg<sup>2+</sup> ionty**
  - Ovlivňují aktivitu a přesnost polymerázy
- **primer**
  - krátké specifické úseky DNA
  - oligonukleotid 20–25 pb
  - ohraničení oblasti amplifikace DNA
- **DNA polymeráza**
  - termostabilní (odolává teplotám až 98 °C)
  - Taq (*Thermus aquaticus*), Tth (*Thermus thermophilus*)
- **teplota**



- **DNA replikace – *in vivo***

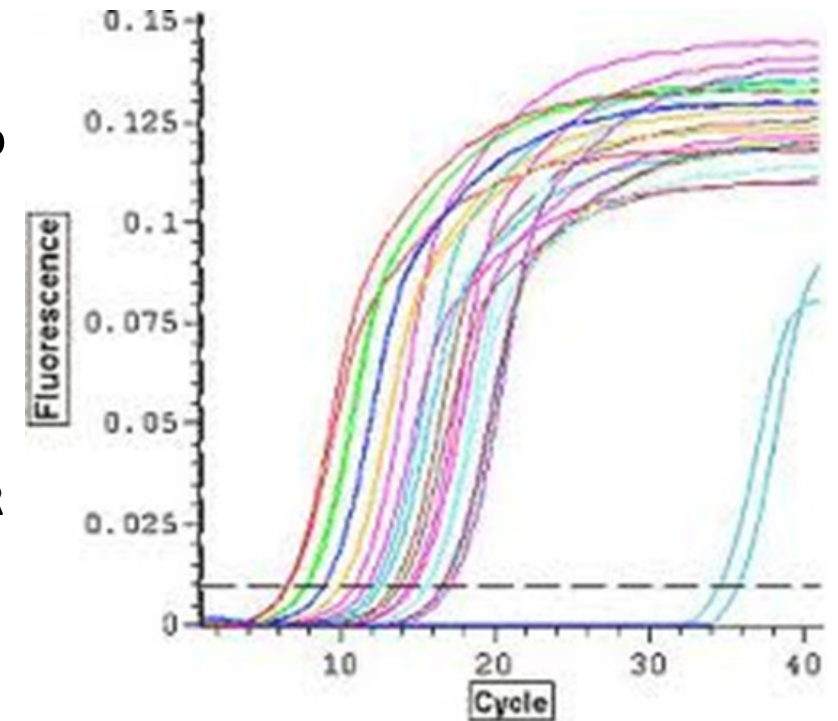
- **enzymy – helikáza, primáza, DNA polymeráza, ligáza ...**





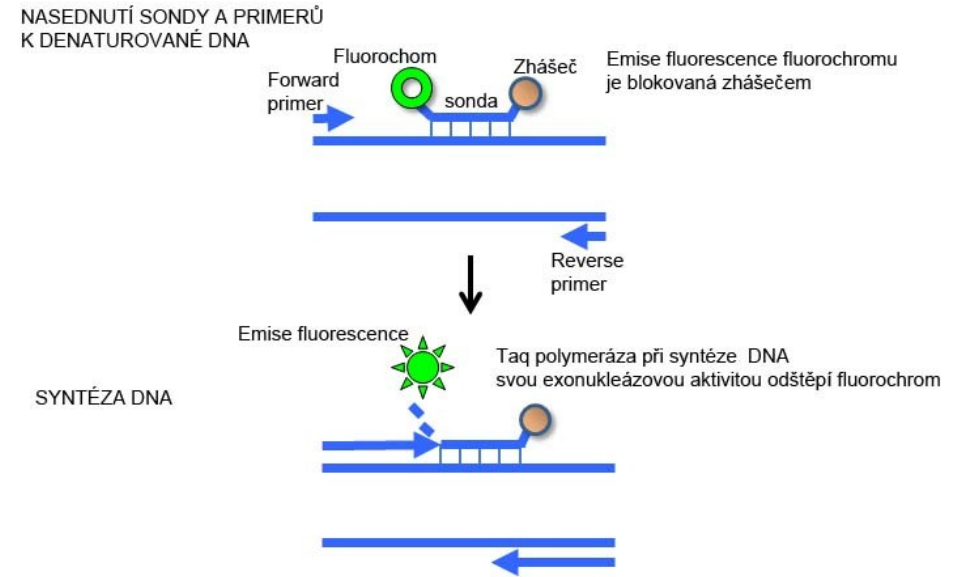
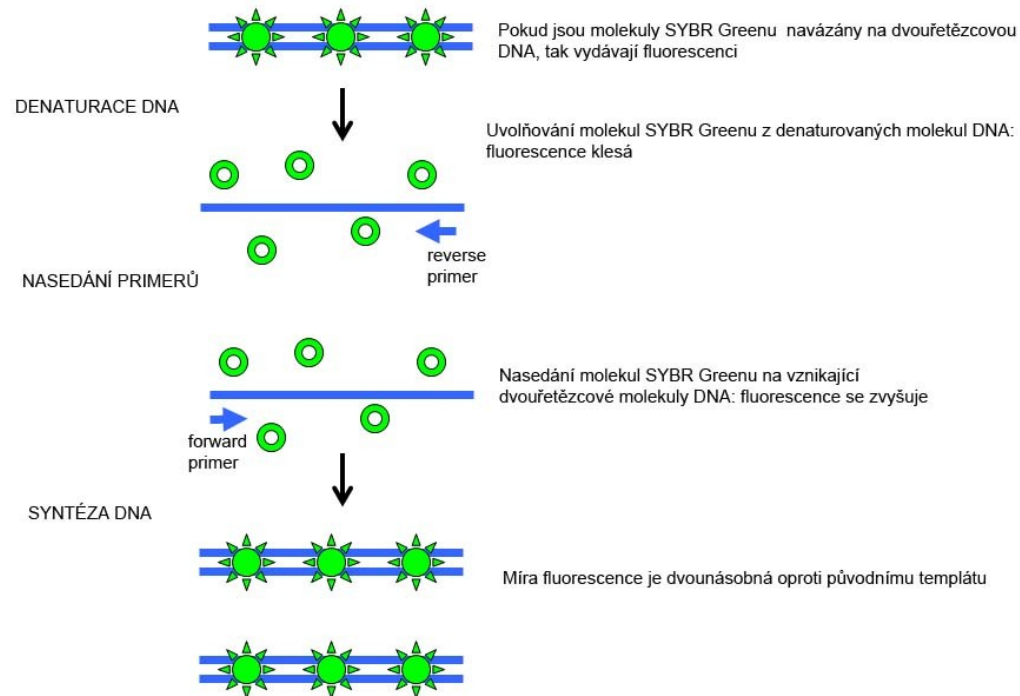
# qPCR – Kvantitativní Real-time PCR

- Polymerázová řetězová reakce sledovaná v reálném čase
- **Kvantifikace DNA** – množství DNA je zaznamenáváno v průběhu každého cyklu
- Detekce množství DNA je umožněna přítomností **fluorescenčního substrátu**
- Provádí se ve speciálním cycleru, který umožňuje:
  - Cyklické střídání teplot
  - Detekci fluorescence
  - Monitorování postupu PCR v reálném čase bez nutnosti detekovat PCR produkty elektroforeticky
- qPCR se obvykle provádí v 96 jamkových destičkách, úroveň fluorescence je zaznamenávána v jednotlivých jamkách
- Vysoce citlivá a vysoce specifická metoda



# qPCR

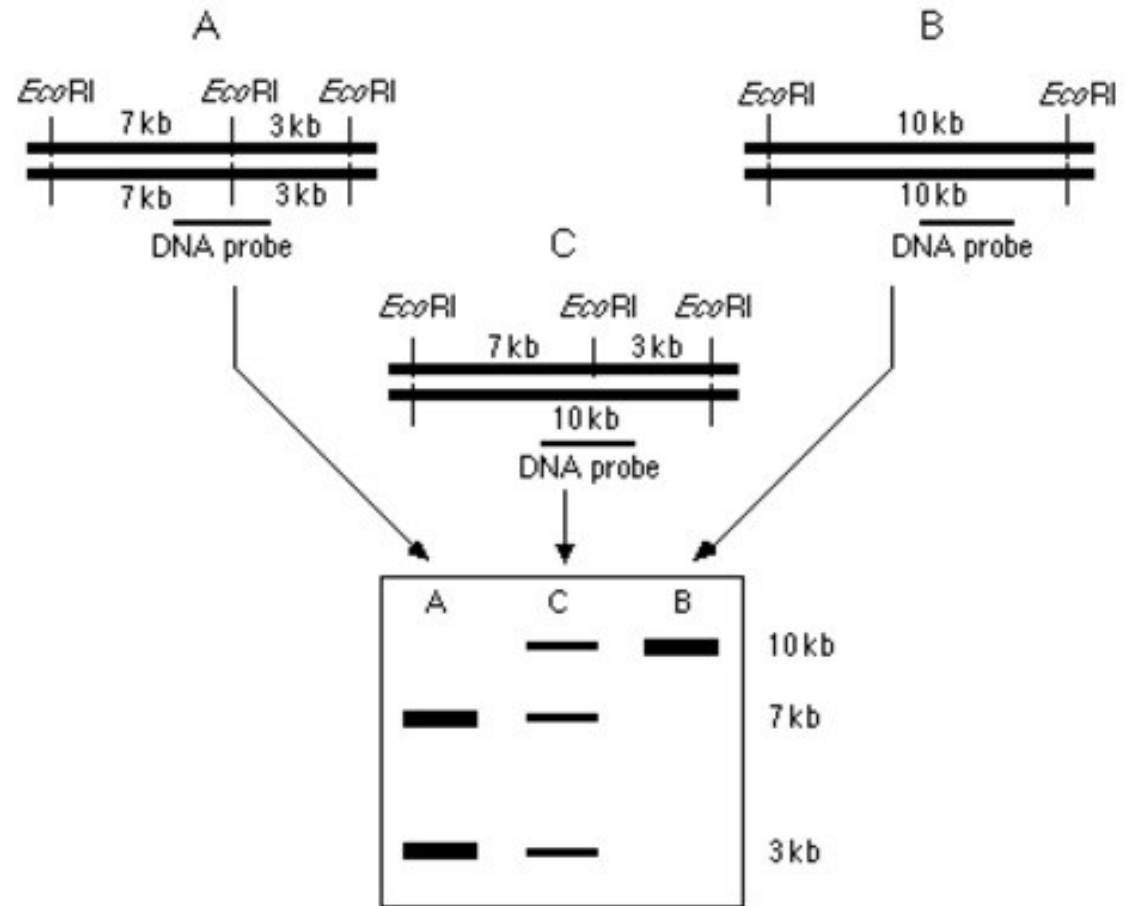
- Intenzita fluorescence je **přímo úměrná množství produktu, který v reakci vzniká**
- Detekce produktu:
  - **interkalační barviva** – Sybr GREEN – nespécificky se váže na dsDNA
  - **sekvenčně specifická sonda** – krátký oligonukleotid s barvičkou a zhasěčem (TaqMan) – po jeho rozpadu při syntéze DNA nárůst fluorescenčního signálu (využívá 5' -3' exonukleázovou aktivitu DNA polymerázy)





# RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

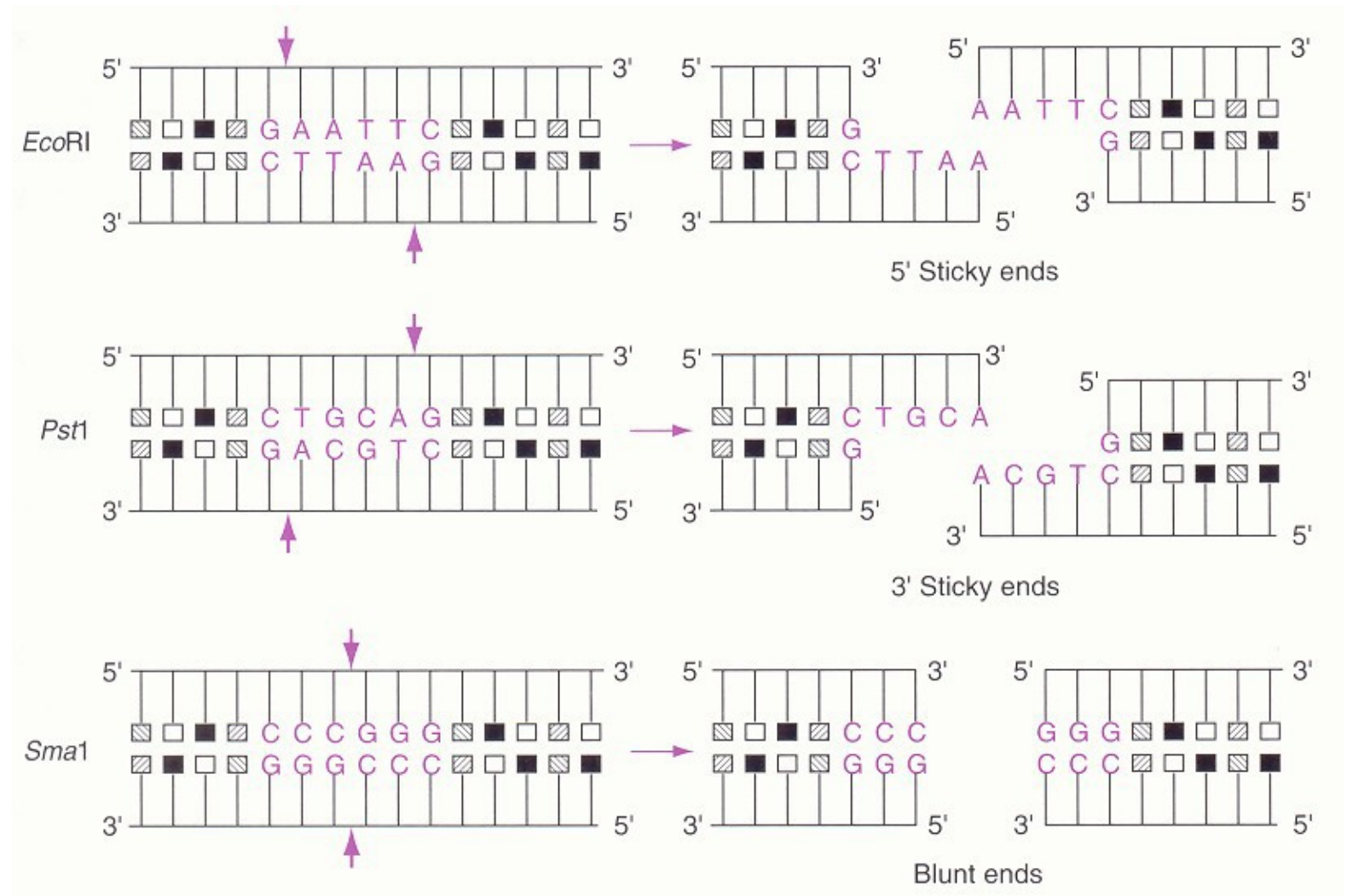
- Enzymatické štěpení DNA ve specifickém restrikčním místě
- **Restrikční endonukleázy**
- Produktem jsou fragmenty o různé délce
- Vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí gelové elektroforézy
- **Využití:**
  - mapování DNA, analýza modifikací DNA, příprava mutantů
  - na základě velikosti a počtu fragmentů lze sledovat rozdíly ve studovaných sekvencích, **tzv. polymorfizmy** (polymorfizmy vznikají přestavbou v řetězci, např. inzercí, delecí, substitucí bází)
  - příbuznost jedinců, určení paternity, identifikace osob



# RFLP

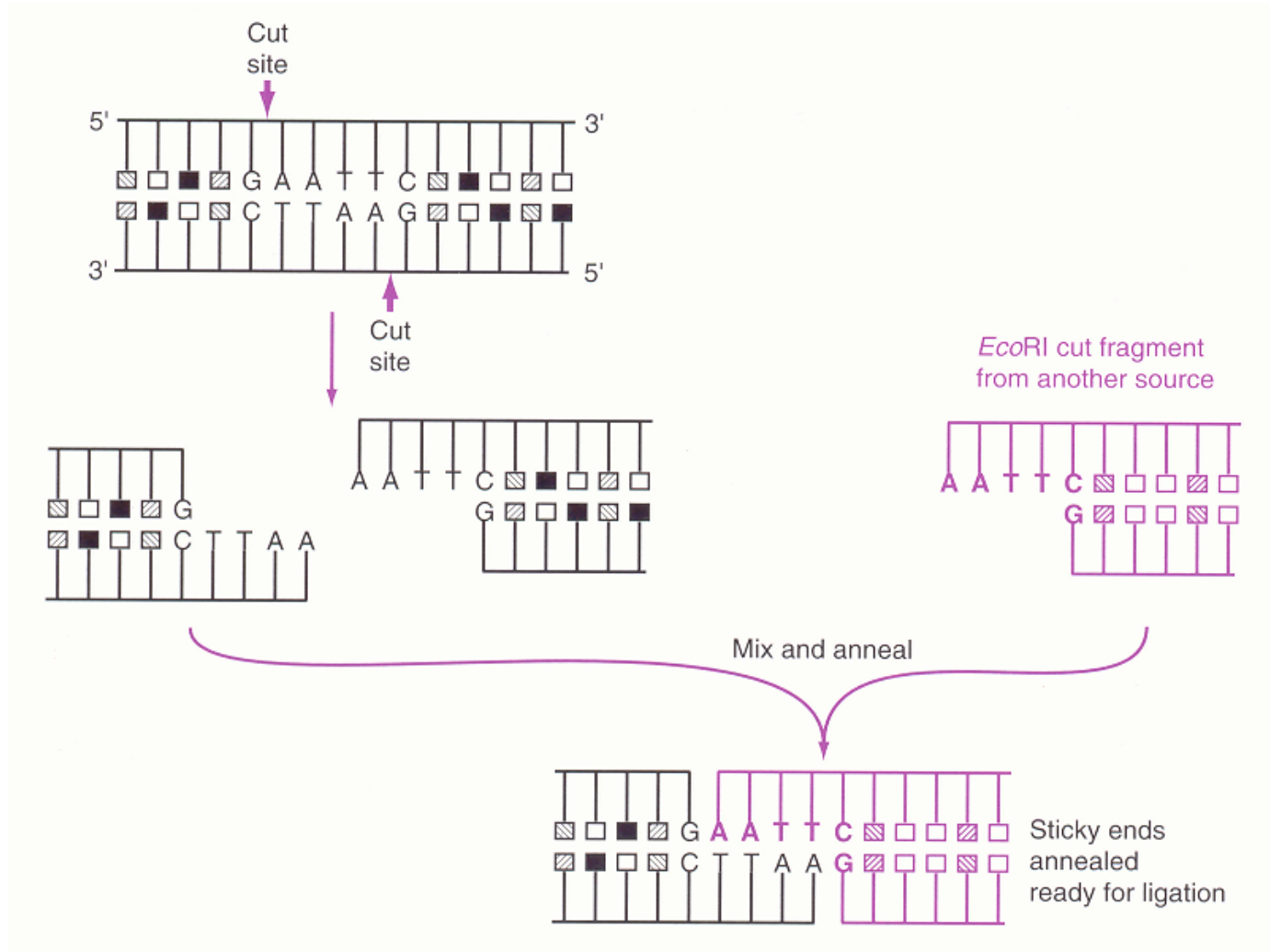
- **Restrikční endonukleáza**

- sekvenčně specifické endonukleázy (původ z bakterií)
- EcoRI (*Escherichia coli*), HindIII (*Haemophilus influenzae*)
- tupé/lepivé konce
- funkce:
  - **rozpoznání specifické sekvence dsDNA a následná restrikce** (hydrolýza fosfodiesterových vazeb)
- rozpoznávací místo
  - 4–8 bp dlouhé
  - charakter **palindromu** = stejné pořadí bází v obou směrech



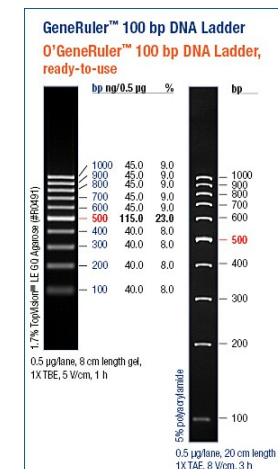
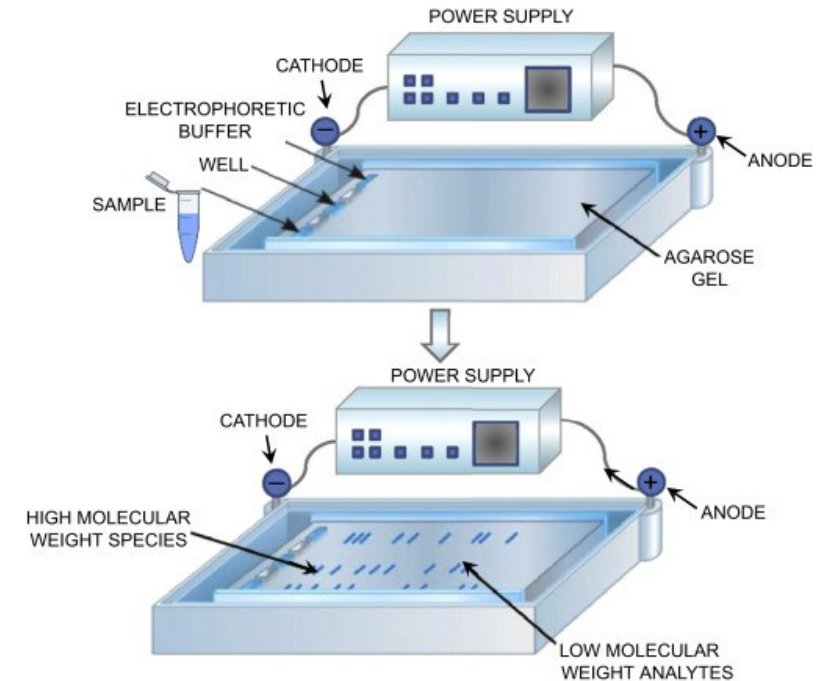
# RFLP

- Přechňávající kompatibilní konce usnadňují spojení různých fragmentů DNA = tvorba rekombinantních DNA



# Gelová elektroforéza - agarózová

- **agarózová** (produkt mořských řas – agar)/polyakrylamidová
- Separační metoda využívaná při izolaci a analýze NK (a proteinů = polyakrylamidová elfo)
- **Princip** – pohyb nabitých molekul ve stejnosměrném elektrickém poli (separace molekul o rozdílné molekulové hmotnosti)
- Rychlost pohybu je závislá na velikosti celkového povrchového náboje, velikosti a tvaru molekuly a její koncentraci v roztoku
- DNA má uniformní negativní náboj → v elektrickém poli se pohybuje **od katody k anodě**
- Části **aparatury**: elektroforetická vana, separační gel, pufr, zdroj stejnosměrného elektrického proudu
- Velikost fragmentu DNA lze stanovit dle hmotnostních standardů (= restriční fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž velikost byla stanovena sekvenováním)
- EtBr – vmezeří se mezi báze, zviditelní DNA pod UV



# Sekvenace DNA

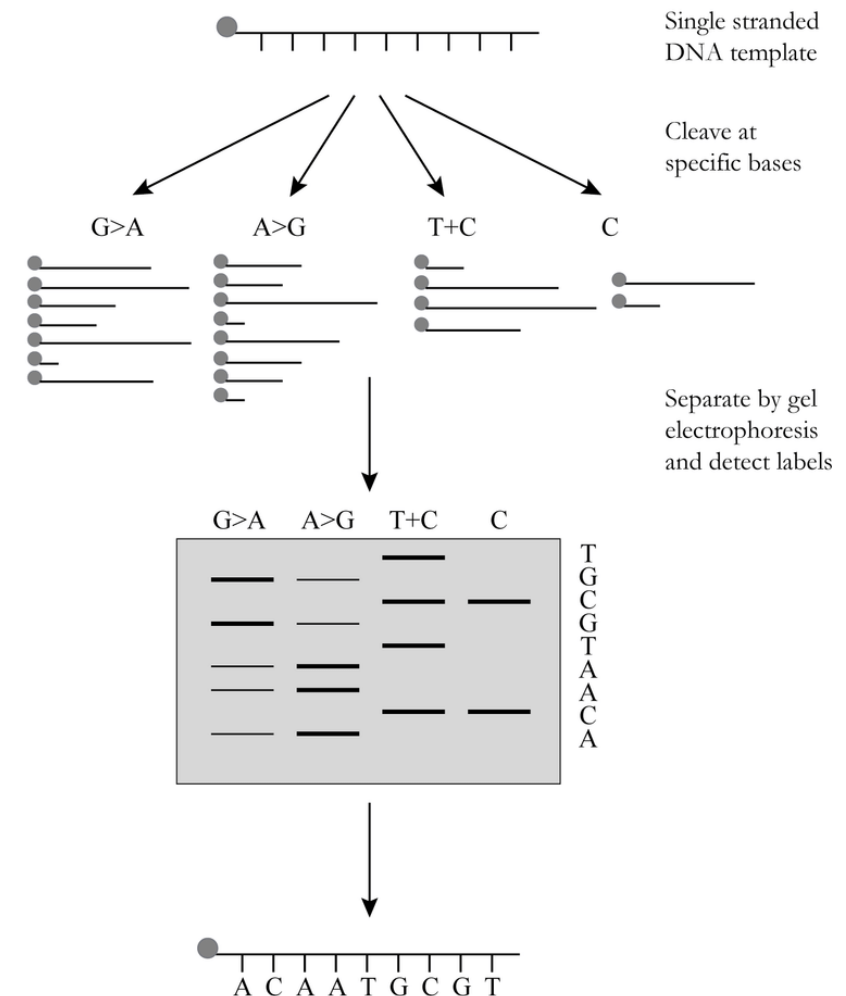
- Stanovení **primární struktury DNA** (pořadí nukleotidů)
  - a) chemická metoda** – dříve; degradace řetězců nukleových kyselin pomocí chemických činidel (dimethylsulfát, NaOH, hydrazin,..) – Maxam-Gilbertova metoda
  - b) enzymatická metoda** – specifická inhibice enzymové syntézy DNA (ddNTP) – Sangerova metoda
  - c) moderní velkoformátové aplikace** založené např. na pyrosekvenování (**sekvenování nové generace**)
- **Produkt** – řetězce ssDNA, jejichž vzájemná velikost se liší o jednu bázi (elfo rozdělení)
- **Vstupní materiál** – fragment DNA s přesně definovanými konci



# Maxam-Gilbertovo sekvenování

- Sekvence je odvozena z molekuly DNA, která se chemicky degraduje na fragmenty v místech, kde se vyskytuje báze určitého typu. Ty se následně separují pomocí elfo.
- **Chemická činidla** – příklad:
  - piperidin narušuje glykosidovou vazbu A a G (A + G)
  - hydrazin za přítomnosti NaCl reaguje pouze s C
  - NaOH při 90 °C způsobuje silné štěpení u A a slabé štěpení u C (A > C)
- Vyžaduje radioaktivní značení na jednom konci ssDNA.
- Reakce je prováděna ve 4 zkumavkách – v každé zkumavce jsou štěpeny pouze určité typy bází.
- Vzniká směs různě dlouhých fragmentů končících v místě určité báze → vyhodnocení pomocí elfo, stanovena sekvence daného úseku.

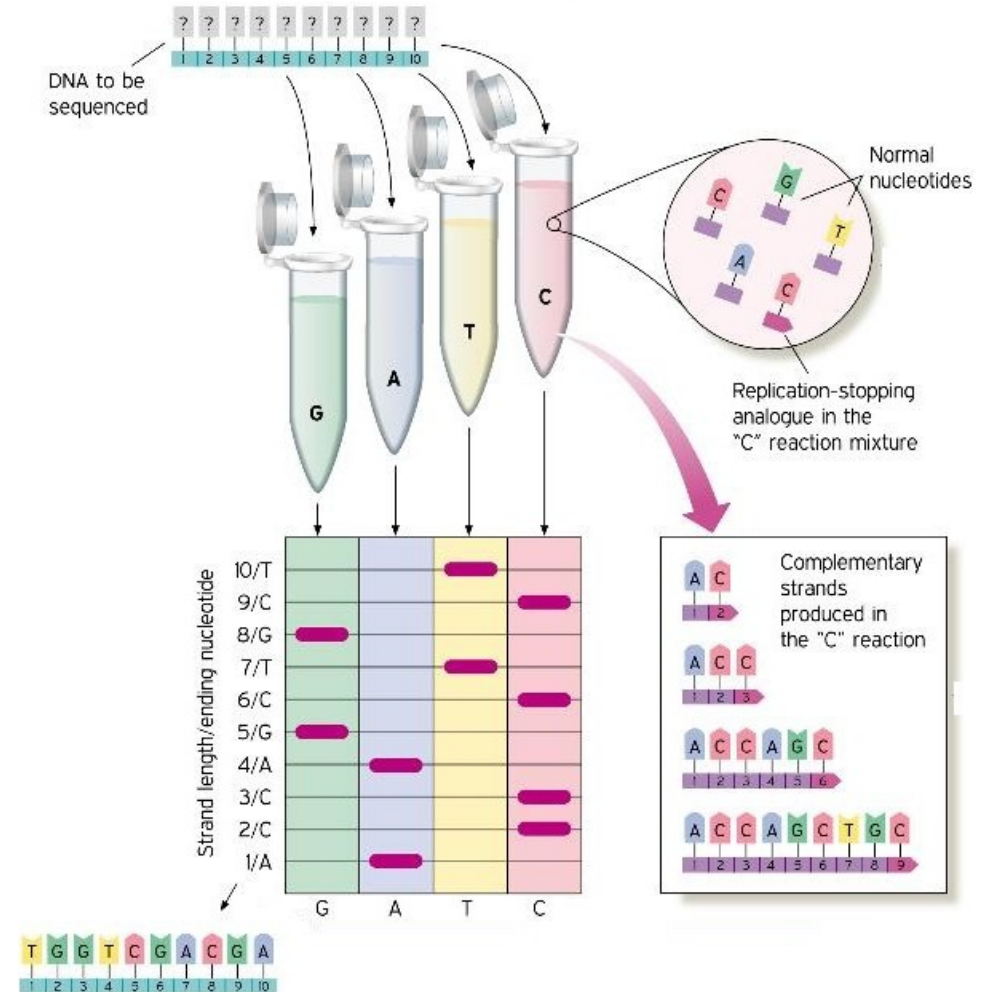
● label





# Sangerovo sekvenování

- Enzymová metoda
- Založeno na **principu replikace** – ukončení syntézy DNA v okamžiku, kdy se ddNTP zařadí na místo dNTP
- **ddNTP** = analog dNTP, ale postrádá hydroxylovou skupinu na 3' pozici uhlíku
- ddNTP – koncové terminátory
- **Reakční směs (4x)**
  - DNA templát
  - primer
  - ddNTP – v nízké koncentraci
  - dNTP – v nadbytku (aby bylo možné získat fragmenty všech možných délek)
  - Taq DNA polymeráza - syntéza DNA od 5' ke 3' konci
  - pufr
- **Vyhodnocení** – elektroforéza
- Modifikace → fluorescenčně značené ddNTP (4 různé barevné značky) – reakce provedena v jedné zkumavce

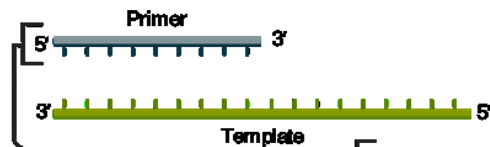


# Sangerovo sekvenování

- Kapilární sekvence DNA s fluorescenčně značenými ddNTP

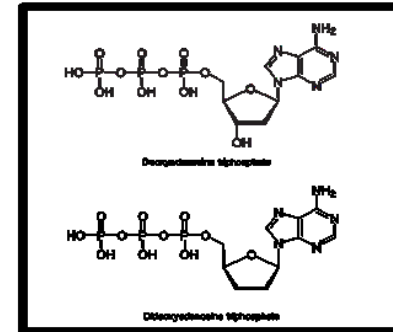
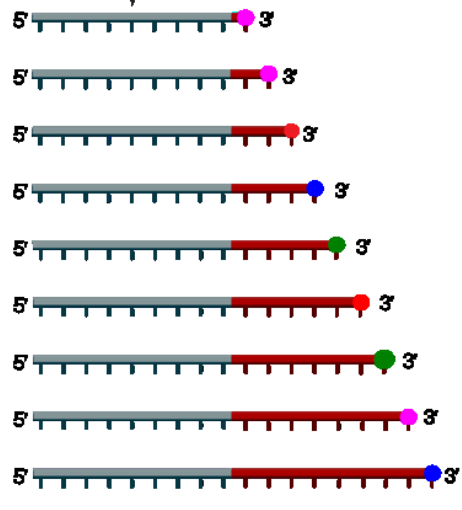
## ① Reaction mixture

- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)

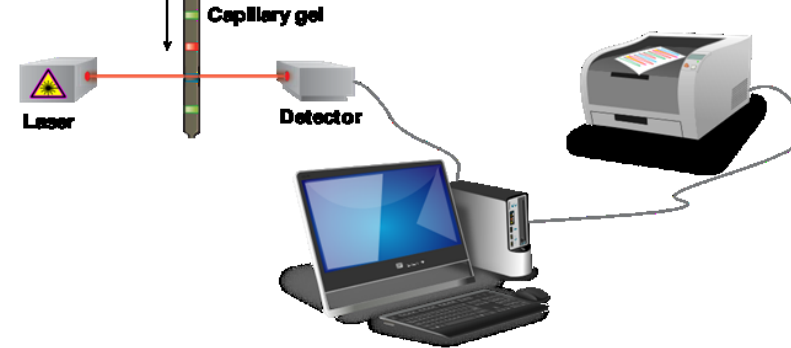


- ddNTPs
- ddTTP (red)
- ddCTP (blue)
- ddATP (green)
- ddGTP (magenta)

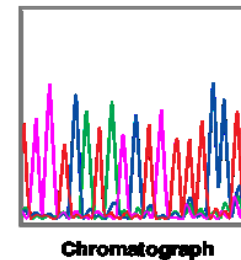
## ② Primer elongation and chain termination



## ③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments



## ④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis





# Praktická část cvičení

# PCR

## 1. Praktické provedení PCR

Objem v mikrozkušavce: 25 $\mu$ L

Složení (1 vzorek):

- templátová DNA (2 $\mu$ L)
- 2 primery (1.25  $\mu$ L)
- MgCl<sub>2</sub> 25mM (4  $\mu$ L)
- dNTP mix (0.5  $\mu$ L)
- Taq polymeráza 1U (1  $\mu$ L)
- pufr (2.5  $\mu$ L)
- PCR H<sub>2</sub>O (12.5  $\mu$ L)

MASTER MIX



1 kapka minerálního oleje



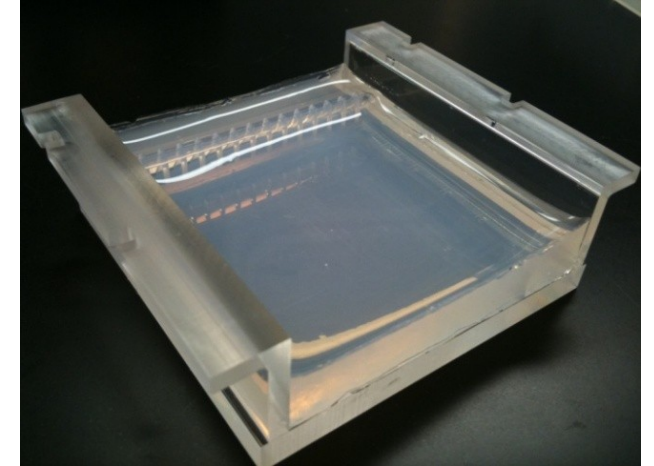
1. 95°C.....5minut
  2. 95°C.....1 minuta
  3. 60°C.....1minuta
  4. 72°C.....1minuta
  5. 72°C.....7minut
  6. 10°C.....10minut
- } 35x



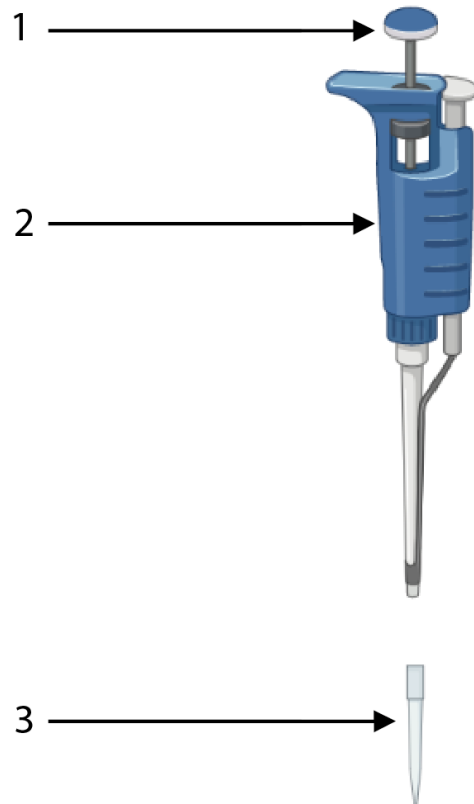


# ELFO – praktické provedení

1. Připravit nalévací misku + hřebínky.
2. Připravit gel (2%): navážit agarózu a přenést do Erlenmayerovy baňky, přidat 1x TBE pufr (200 ml).
3. Zvážit a v mikrovlnce přivést k varu.
4. Po zchladnutí na cca 40 °C přidat EtBr (1 ul / 10 ml).
5. Nechat gel ztuhnout (cca 30 min).
6. Odstranit hřebínky a gel vložit do elektroforetické vany s 1x TBE pufrem (elektrolyt).
- 7. Připravit kapky nanášecí barvy na parafínový papír a smíchat s vzorky DNA.**
- 8. Vzorky nanést do jamek.**
- 9. Zapojit do zdroje elektrického napětí.**
- 10. Sledovat postup DNA gelem (20min).**
- 11. Vizualizace pod UV a vyhodnocení.**



# Práce s mikropipetou



Mikropipeta

1 - dvoupolohový ovladač

2 - držák

3 - jednorázová špička

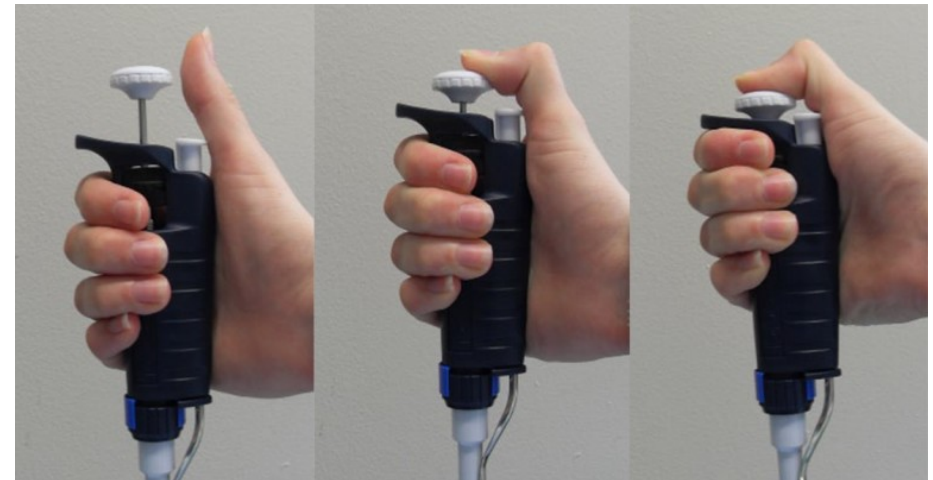
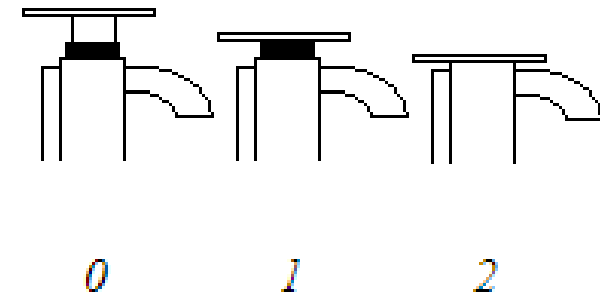
- Pipetu držím vždy **vertikálně** (špičkou dolů).
- Pipetu držím v dlani zavěšenou za ukazováček a ovládám ji palcem.
- **Vyberu optimální rozsah objemu!!! Nikdy nepřekračuju rozsah pipety nahoru ani dolů!!!**
- Před pipetováním musíme na pipetu nasadit příslušnou **špičku** (dle objemového rozsahu pipety).
- Vždy používám novou **sterilní špičku**.
- Pokud opakovaně pipetuju tentýž roztok, ponechám na pipetě po celou dobu práce tutéž špičku.
- K odhazování špiček slouží tlačítko na boční straně pipety.

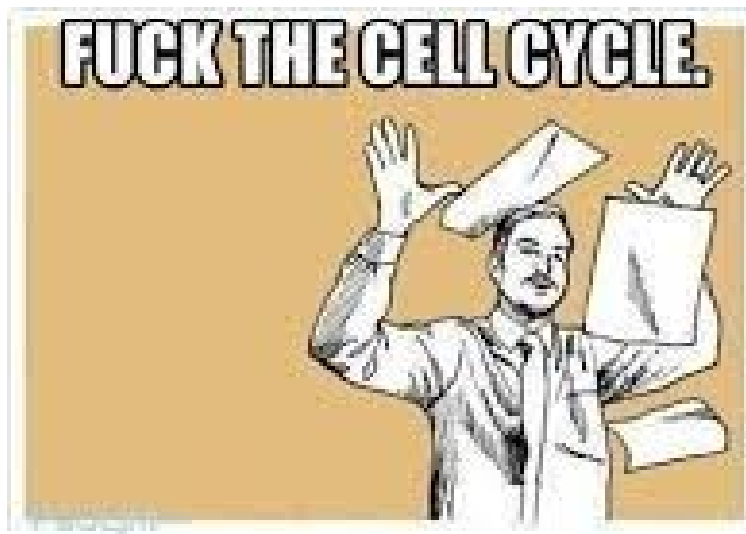
# Práce s mikropipetou

## Postup:

- Na pipetě nastavím požadovaný objem. Vodorovná čára na displeji značí desetinnou čárku.
- Nasadím špičku na pipetu (důkladně utěsním) – **ne rukama!**
- Pipetu uchopím tak, abych si o ukazováček podepřel/a držák a palcem tak mohl/a pracovat s dvoupolohovým ovladačem.
- **Nasátí:** ovladač stlačím do polohy „1“ (špička je ve vzduchu), ponořím do roztoku a **pomalou** pustím.
- **Vypuštění:** pipetu ponořím do roztoku, kam chci pipetovanou látku přidat. Vypustím roztok stlačením ovladače do polohy „1“, dokončím stlačením do polohy „2“ a vyjmutím špičky z roztoku (stále v poloze „2“).
- Ovladač pustím, špičku vyhodím.

Obr. 3.2.2: Polohy ovladače:





**Děkujeme za pozornost**