

Metody molekulární biologie DNA diagnostika

Mgr. Katarína Chalásová, PhD.

Osnova

1. Opakování pojmů z molekulární biologie
2. Genetická DNA diagnostika
3. Základní metody molekulární biologie
4. Praktická ukázka a vlastní provedení PCR

1. Opakování pojmů z molekulární biologie

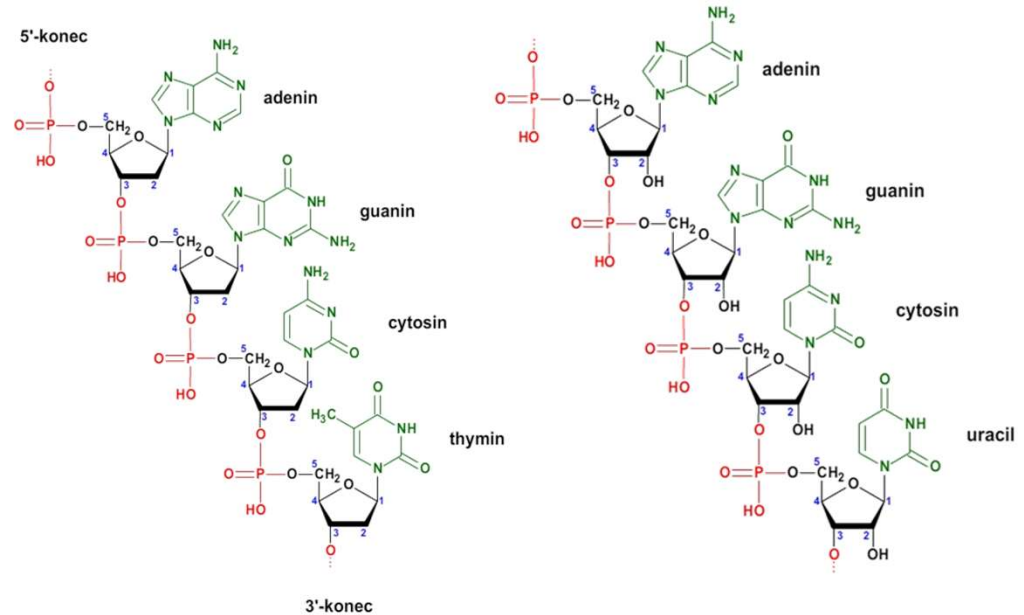
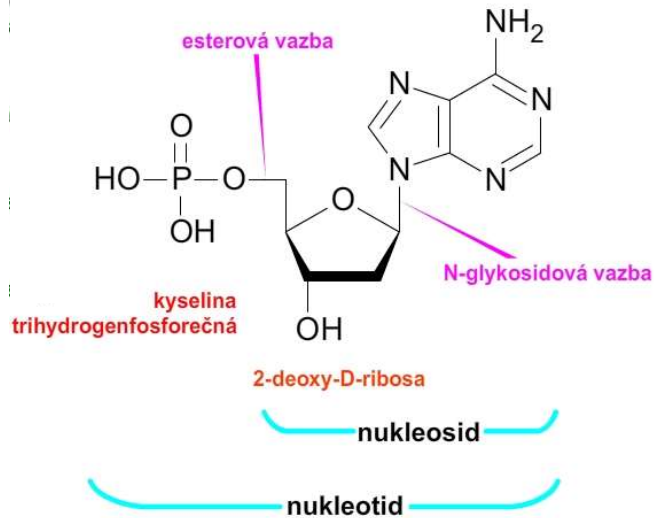
Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

- nukleové kyseliny, rozdíl mezi RNA a DNA,
- primární stavba DNA a RNA, dusíkaté báze, nukleotid, nukleosid
- sekundární stavba DNA a RNA, dvojzávitnice, párování bází
- replikace DNA – kde, kdy, enzymy, vedoucí a opožďující se řetězec
- transkripce – kde, typy RNA, enzymy, posttranskripční modifikace
- translace – kde, ribozomy, endoplazmatické retikulum, genetický kód, kodony vs antikodony, posttranslační modifikace
- centrální dogma molekulární biologie
- mutace vs polymorfismus

1. Opakování pojmů z molekulární biologie

Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

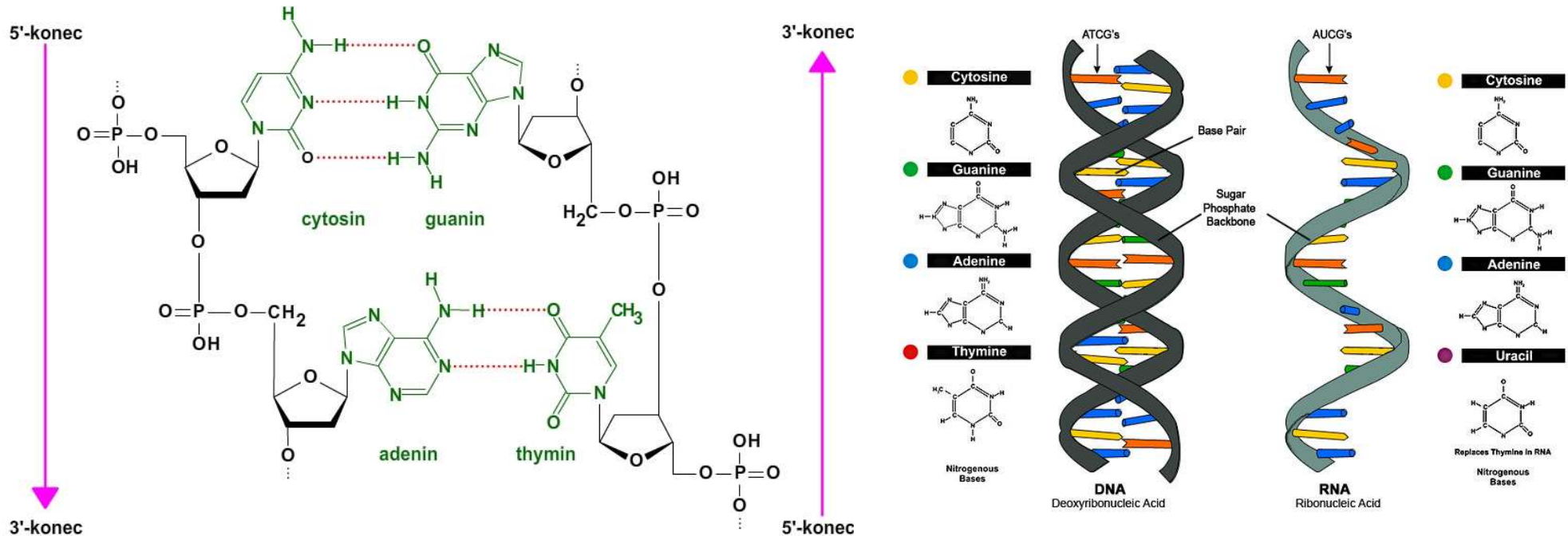
- nukleové kyseliny, rozdíl mezi RNA a DNA
- primární stavba DNA a RNA, dusíkaté báze, nukleotid, nukleosid



1. Opakování pojmů z molekulární biologie

Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

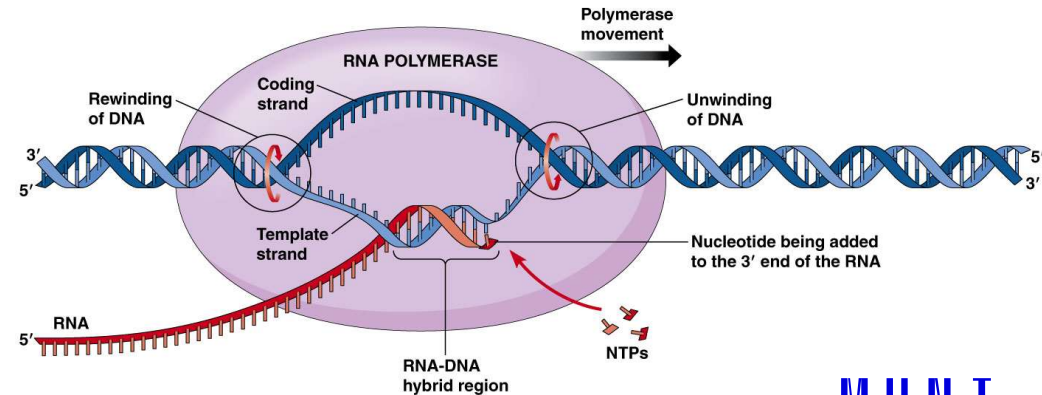
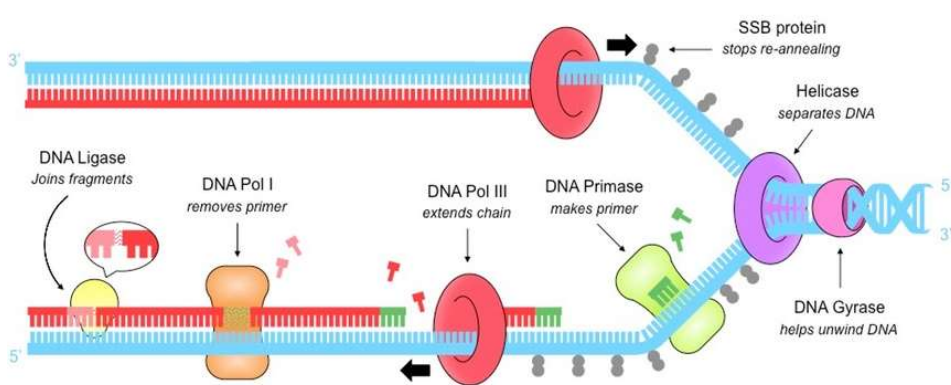
- sekundární stavba DNA a RNA, dvojzávitnice, párování bází



1. Opakování pojmů z molekulární biologie

Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

- replikace DNA – kde, kdy, enzymy, vedoucí a opožďující se řetězec
- transkripce – kde, typy RNA, enzymy, posttranskripční modifikace

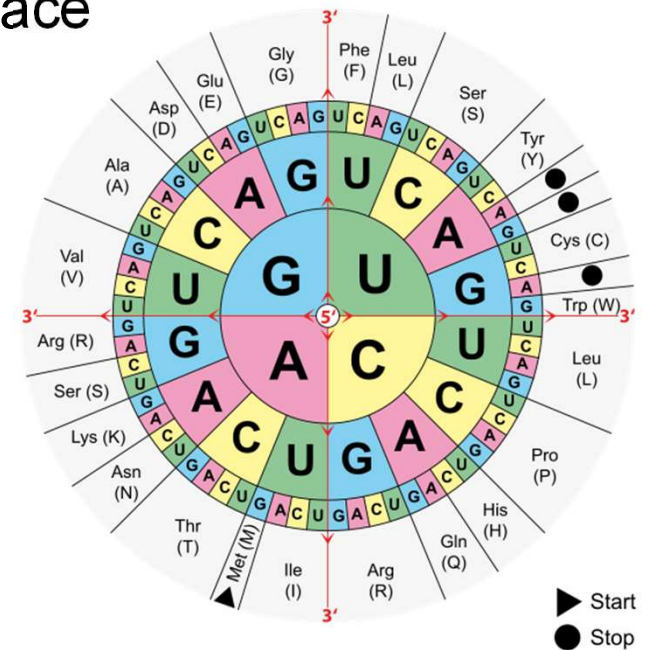
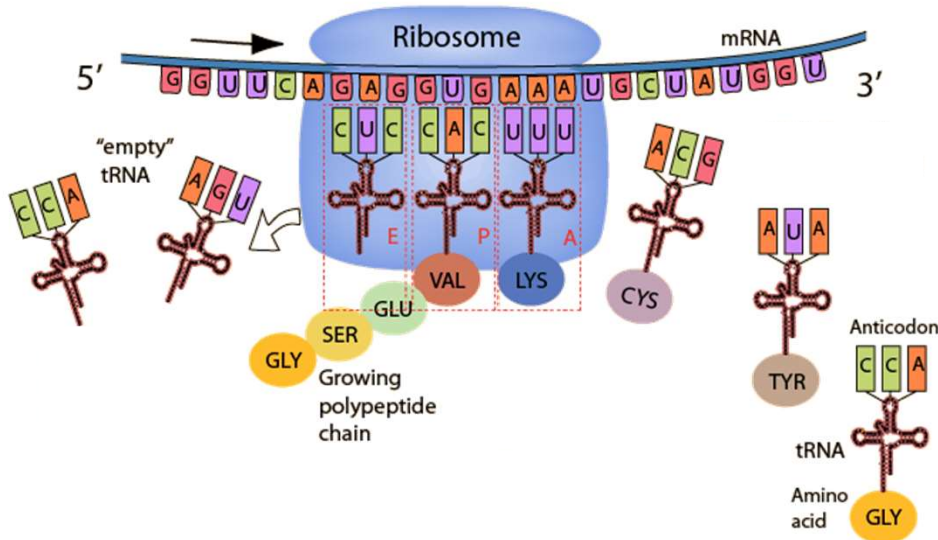


© 2012 Pearson Education, Inc.

1. Opakování pojmů z molekulární biologie

Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

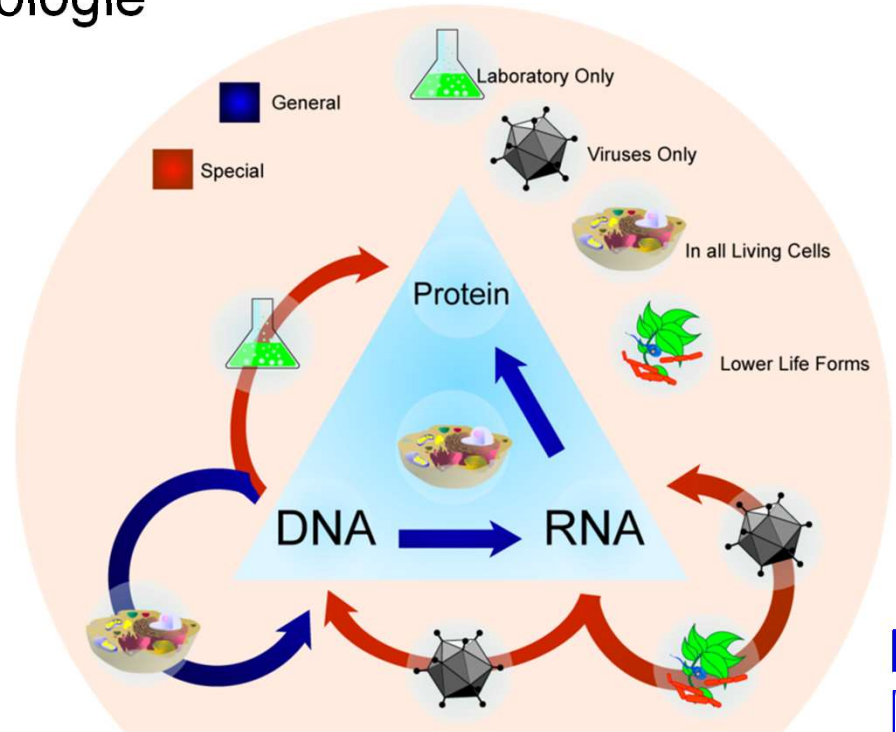
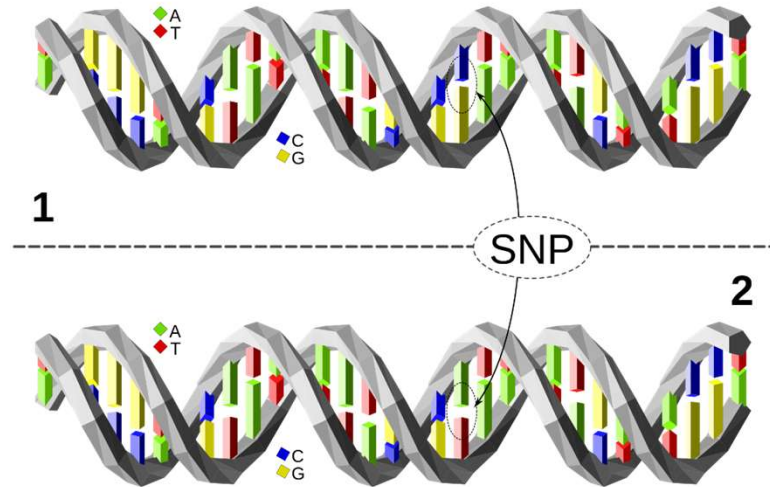
- translace – kde, ribozomy, endoplazmatické retikulum, genetický kód, kodony vs antikodony, postranlační modifikace



1. Opakování pojmů z molekulární biologie

Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

- centrální dogma molekulární biologie
- mutace vs polymorfismus



2. Genetická diagnostika

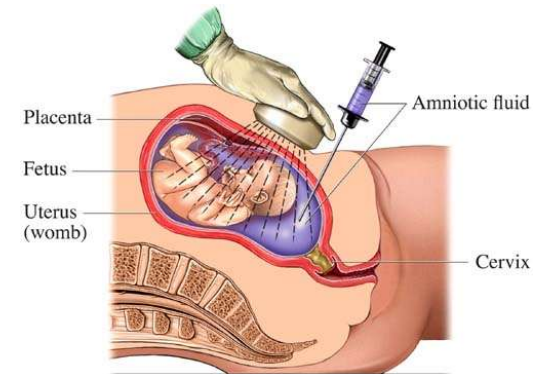
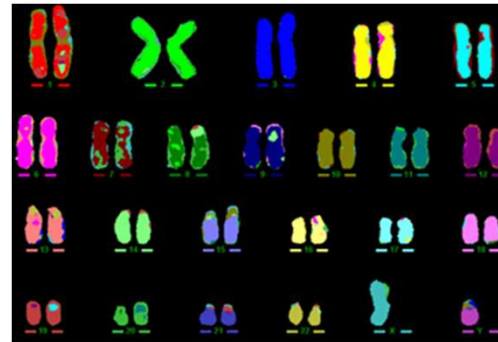
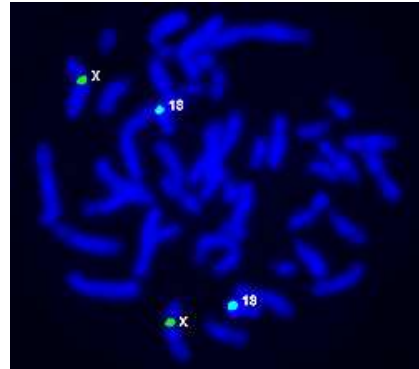
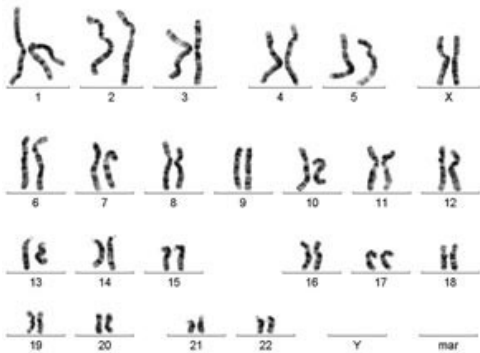
- a) postnatální diagnostika
- b) prenatální diagnostika
- c) preimplantační diagnostika



2. Genetická diagnostika

❖ Cytogenetické vyšetření

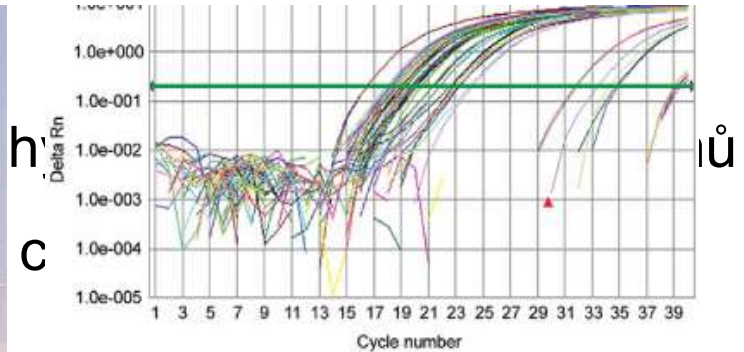
- vyšetřuje chromozomální aberace = odchylky na úrovni chromozomů
- stanovuje se karyotyp, počet a struktura chromozomů



2. Genetická diagnostika



vyš
rom
e ka



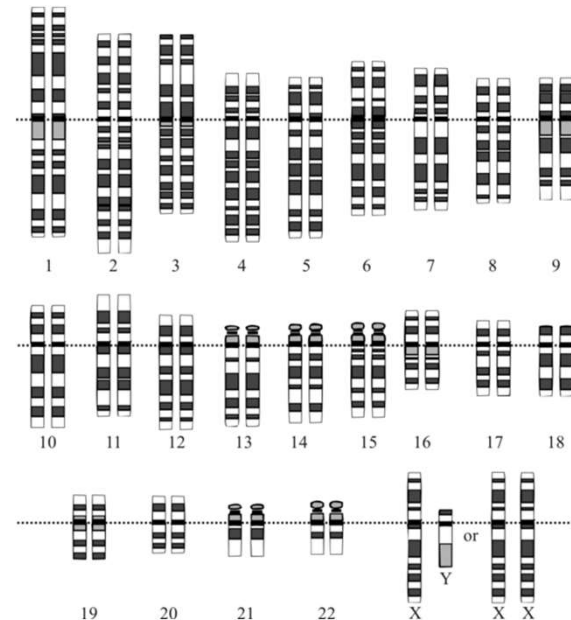
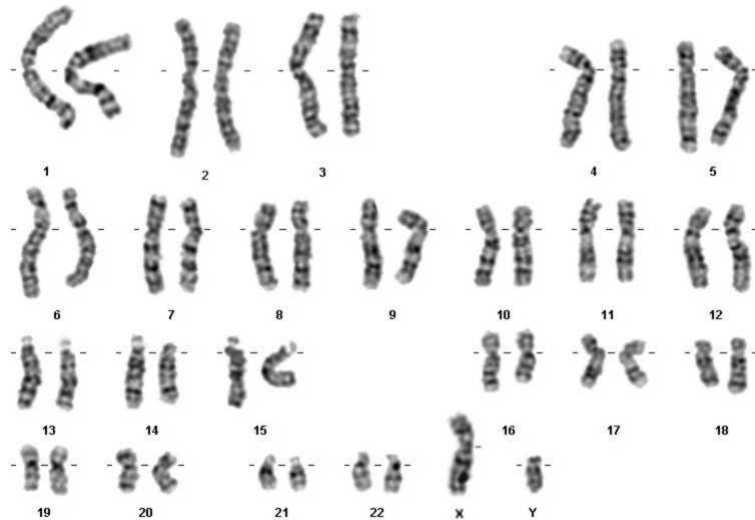
❖ Molekulární genetika

- vyšetřuje nemoci způsobené mutací v genu
- identifikuje patologické změny DNA na molekulární úrovni

* některé cytogenetické metody

G-pruhování = Giemsovo barvení

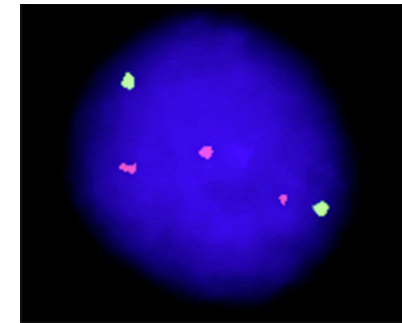
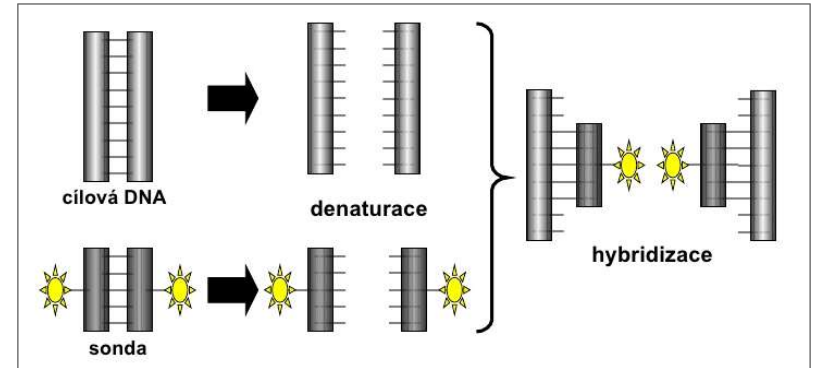
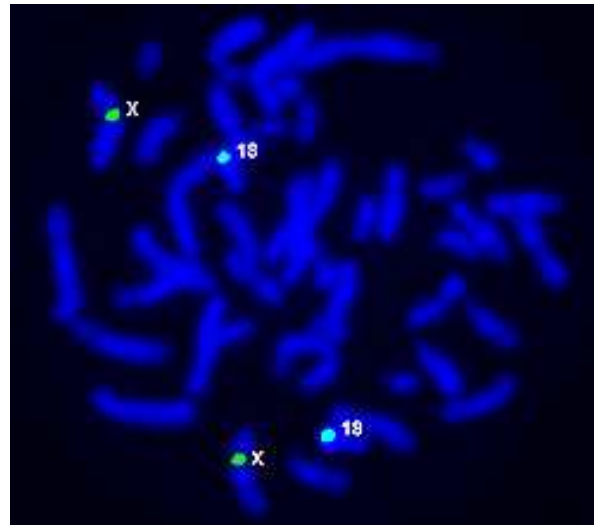
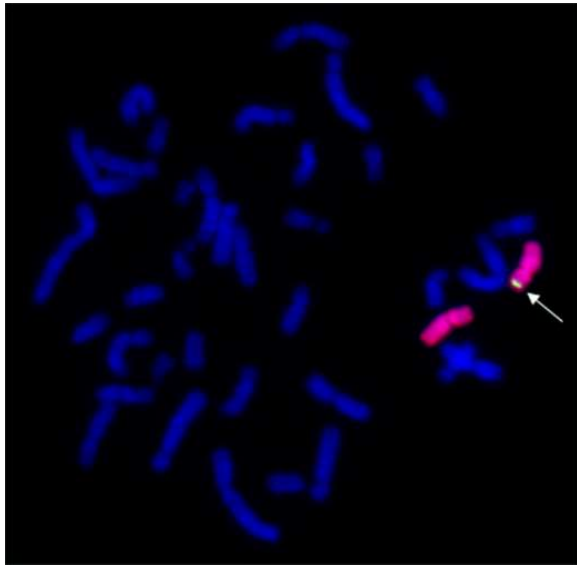
- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromosomy vystaveny účinkům trypsinu a obarveny Giemsovým barvivem
- každý chromosom se specificky obarví



* některé cytogenetické metody

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

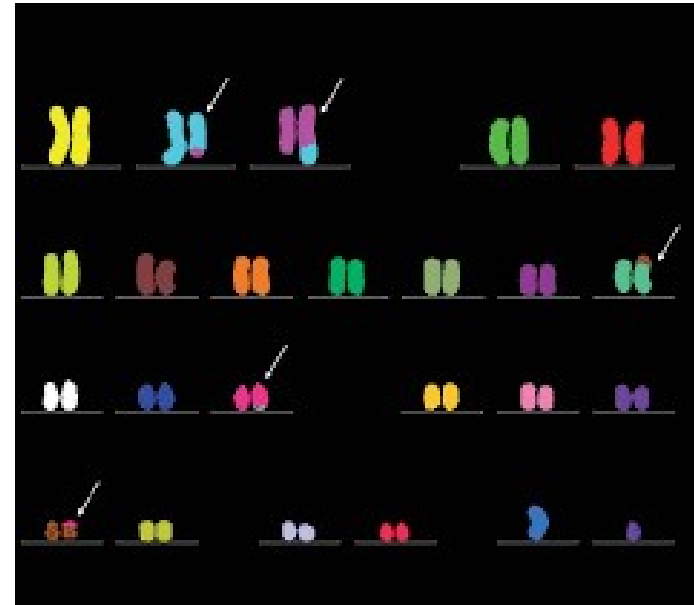
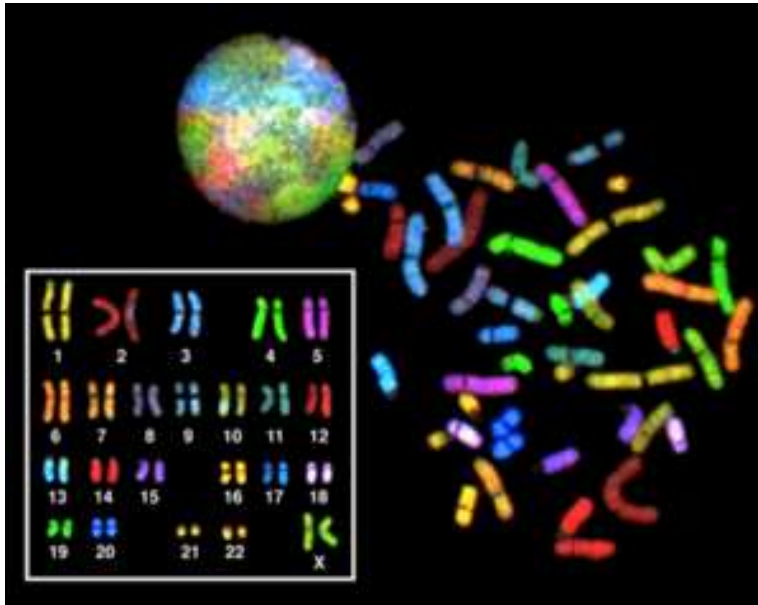
- fluorescenční obarvení části chromozomu pomocí komplementární sondy



* některé cytogenetické metody

Spektrální karyotypování (SKY)

- identifikace každého chromosomu pomocí jedinečné kombinace 5 fluorochromů



3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)

mutace v genu XY
záměna G za A



3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)



- voda + pufr
- templátová / testovaná DNA

3. Metody molekulární genetiky

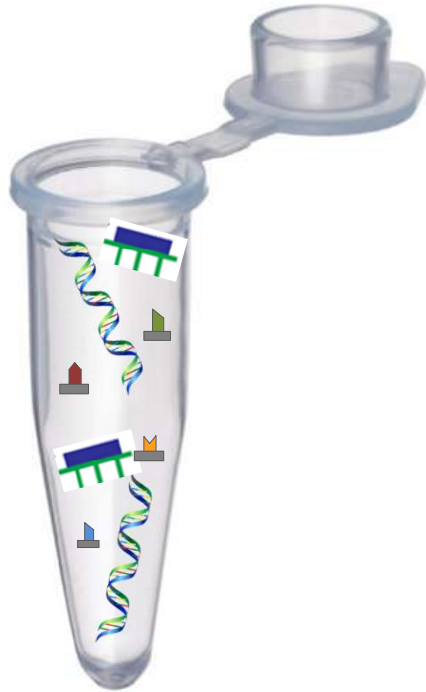
- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)



- voda + pufr
- templátová / testovaná DNA
- primery

3. Metody molekulární genetiky

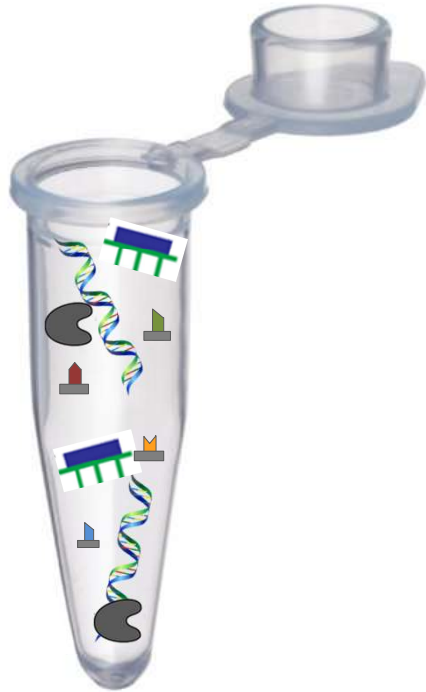
- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)



- voda + pufr
- templátová / testovaná DNA
- primery
- nukleotidy

3. Metody molekulární genetiky

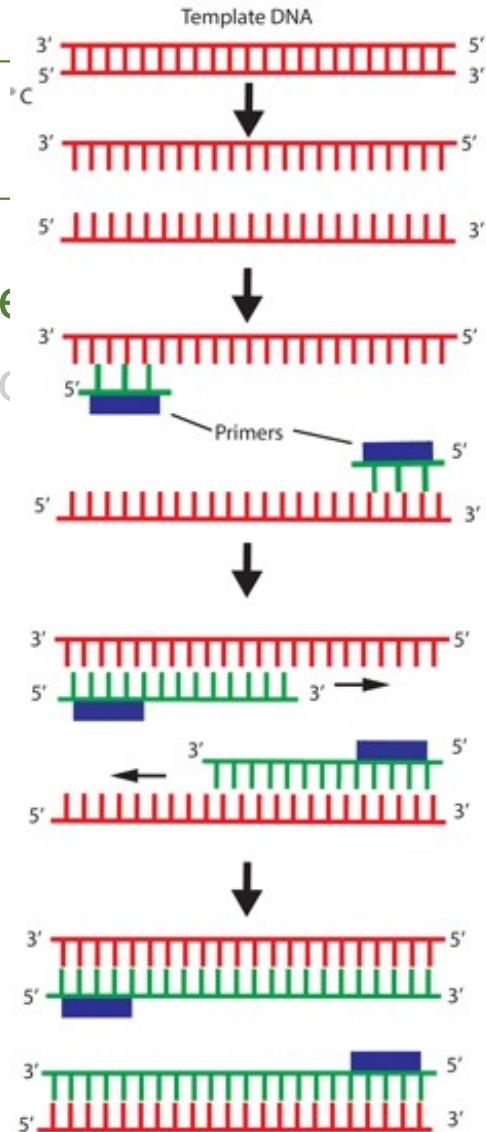
- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)



- voda + pufr
- templátová / testovaná DNA
- primery
- nukleotidy
- enzym DNA polymeráza
- Mg^{2+}

nolekulární genetiky

- polymé
- polymé



akce (PCR)

ikčních fragmentů (RFLP)

- voda + pufr
- templátová / testovaná DNA
- primery
- nukleotidy
- enzym DNA polymeráza
- Mg^{2+}

3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

mutace v genu XY
záměna G za A



3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

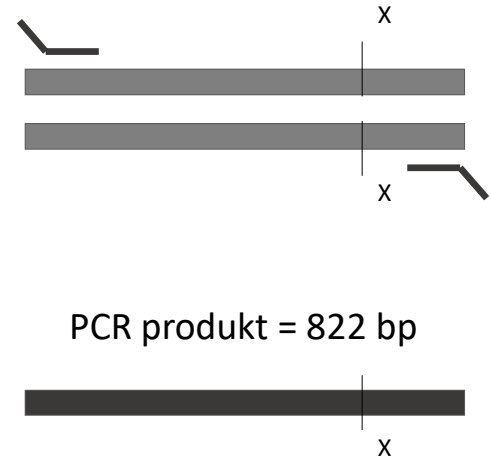
mutace v genu XY
záměna G za A



3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

mutace v genu XY
záměna G za A



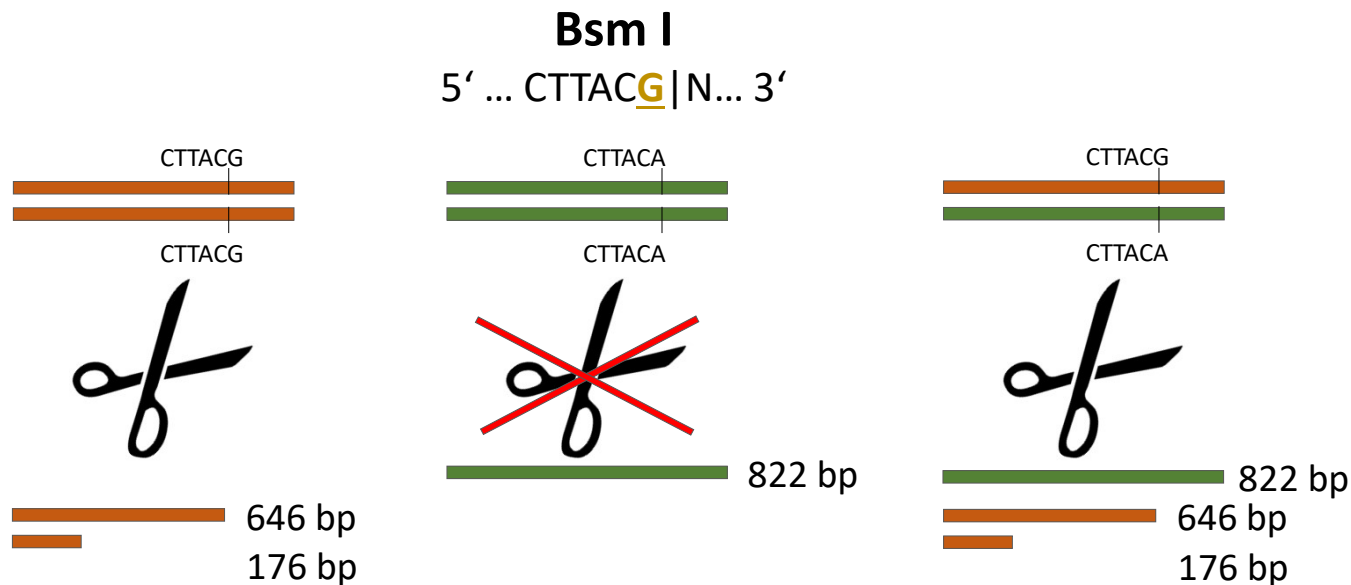
3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)



3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)

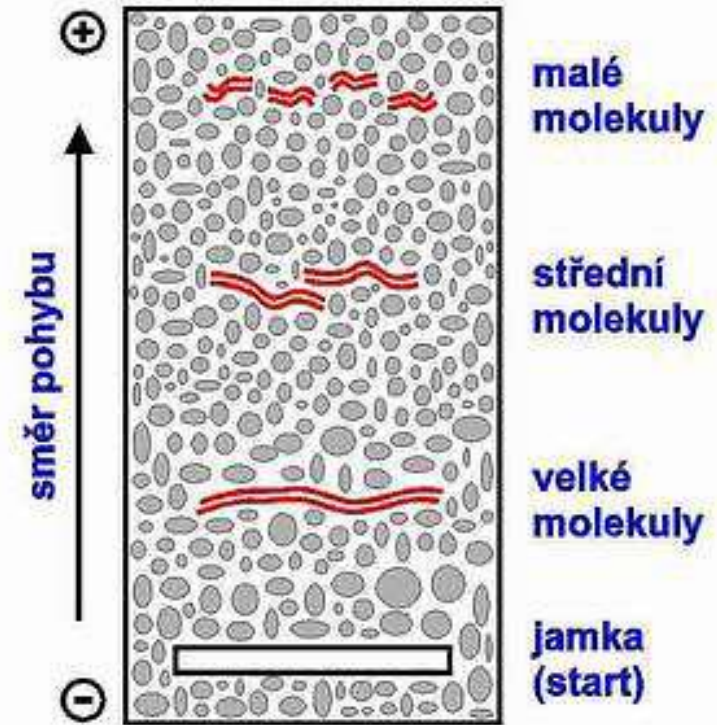


3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)
- gelová elektroforéza
(agarózový gel / polyakrylamidový gél)

3. Metody molekulární genetiky

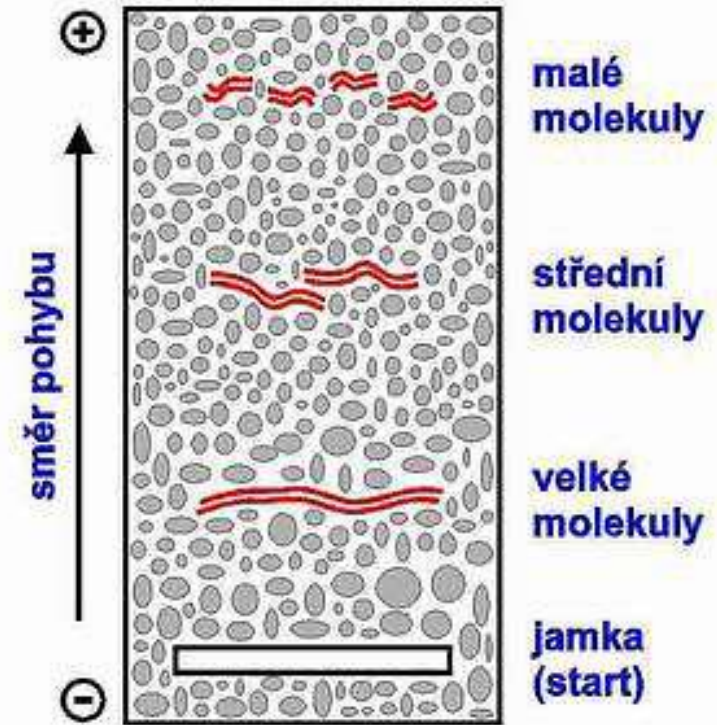
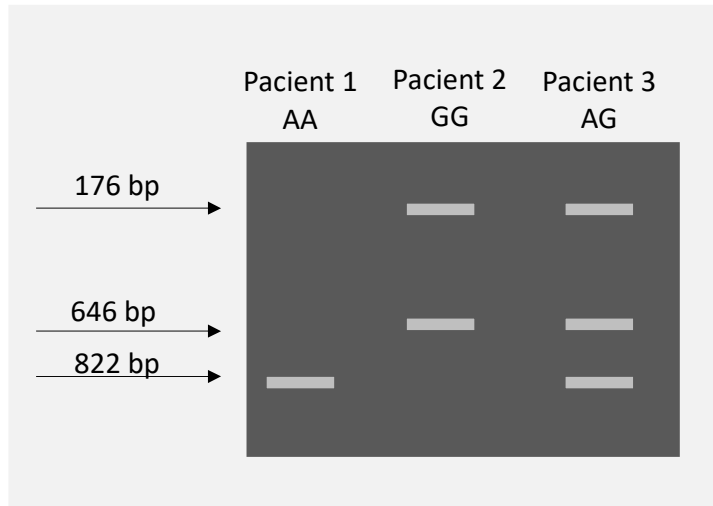
- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů (
- **gelová elektroforéza**
(agarózový gel / polyakrylamidový gél)



Obr. 3. Pohyb molekul různé velikosti v gelu.

3. Metody molekulární genetiky

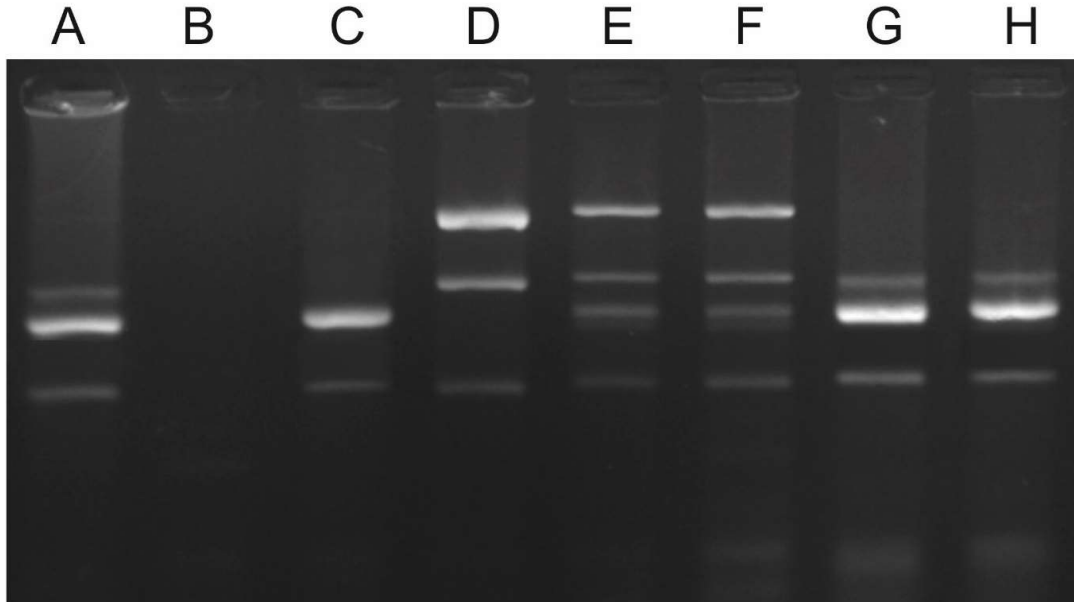
- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů (
- **gelová elektroforéza**
(agarózový gel / polyakrylamidový gél)



Obr. 3. Pohyb molekul různé velikosti v gelu.

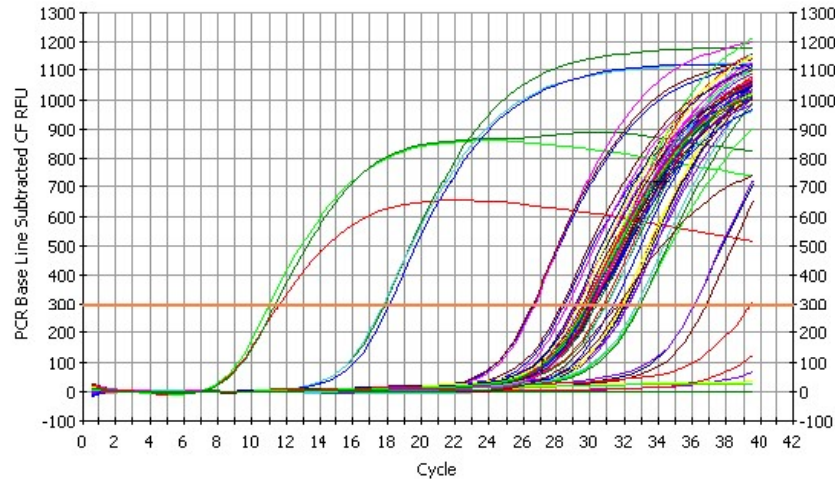
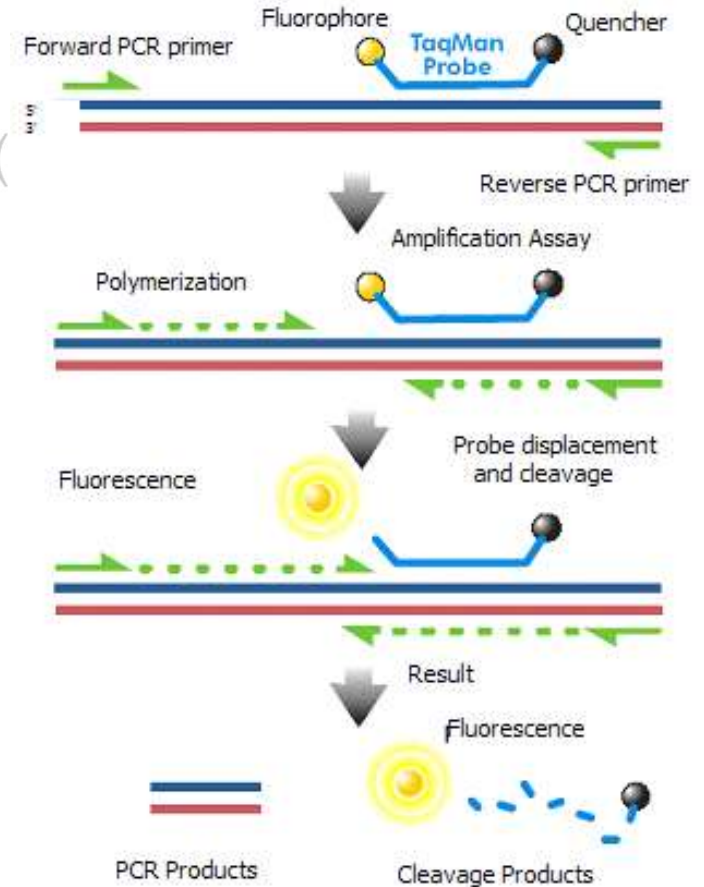
3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů
- **gelová elektroforéza**



3. Metody molekulární genetiky

- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)
- gelová elektroforéza
- PCR v reálném čase (RT-PCR)



MUNI
MED