

Genetika v zubním lékařství – cvičení 2

Metody molekulární biologie

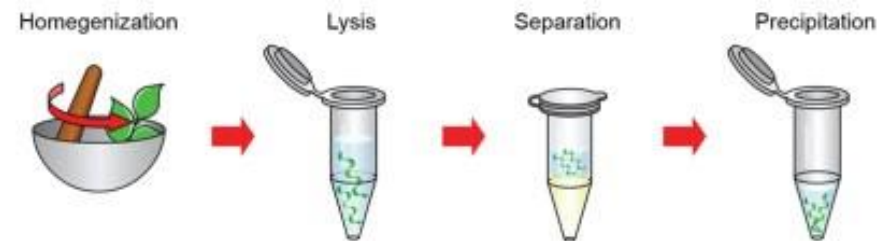
Biologický materiál

- 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

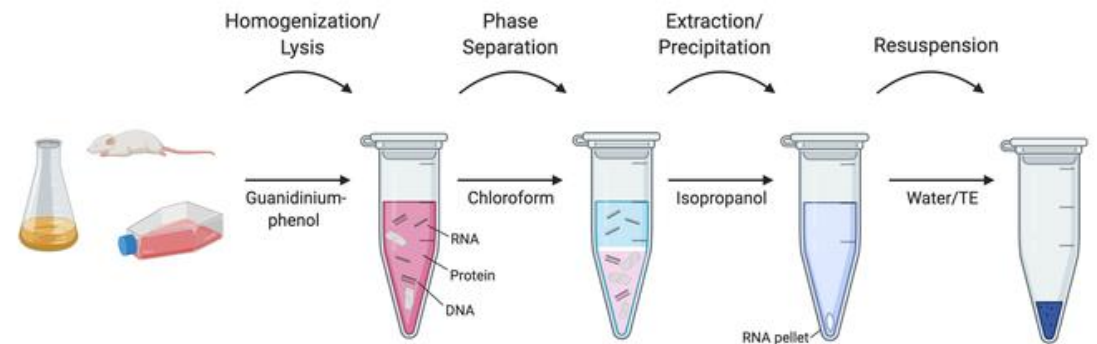


Izolace nukleových kyselin

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

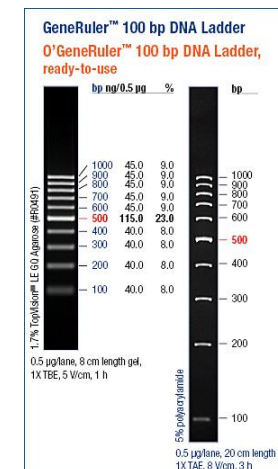
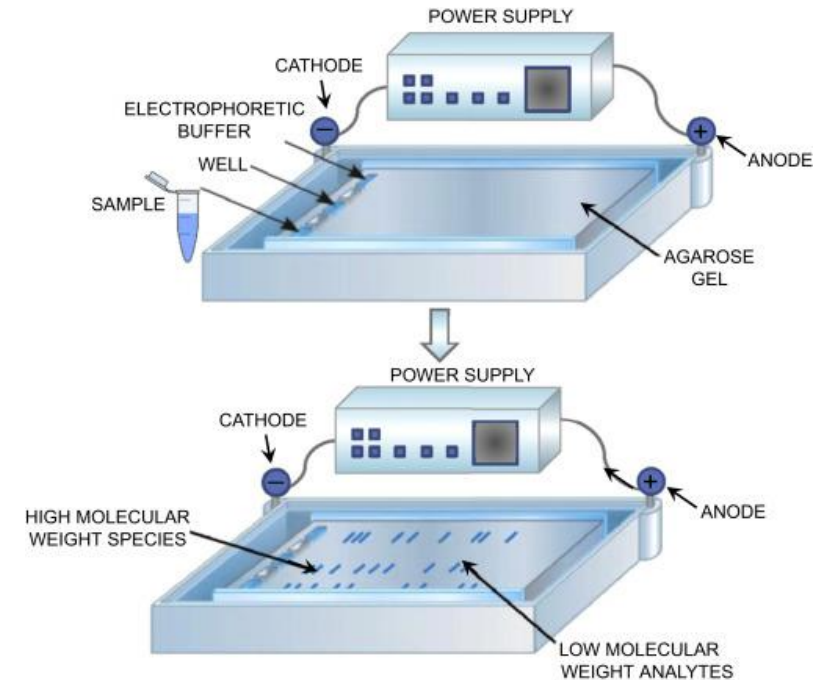


- **Izolace genomové DNA**
- **Izolace RNA** – důraz na ochranu před degradací!

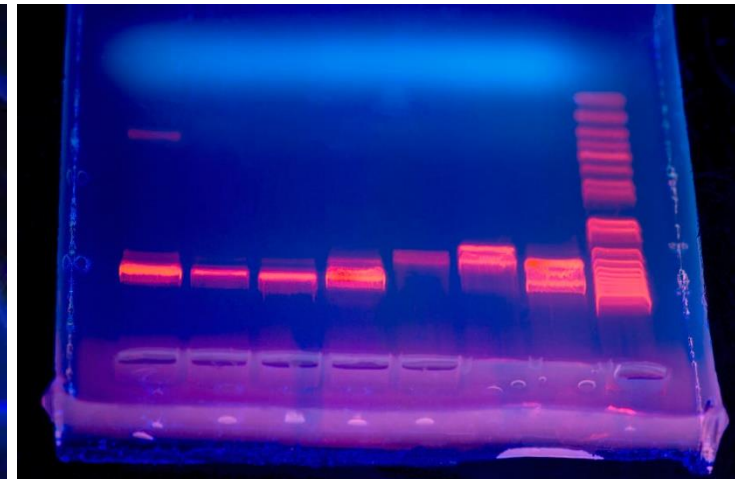
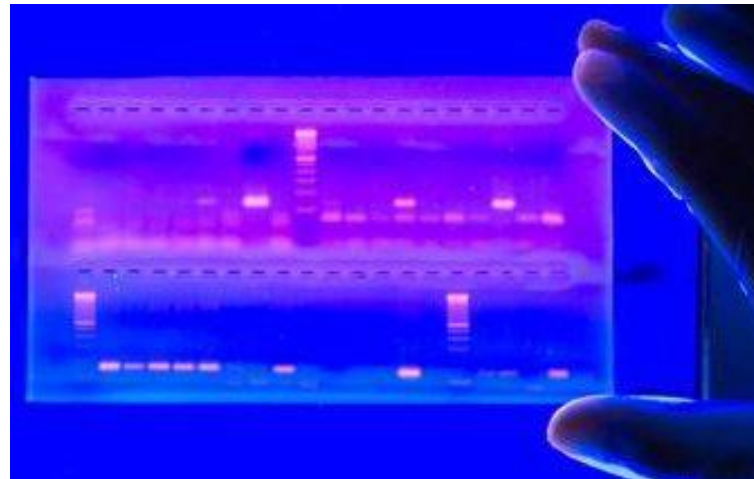
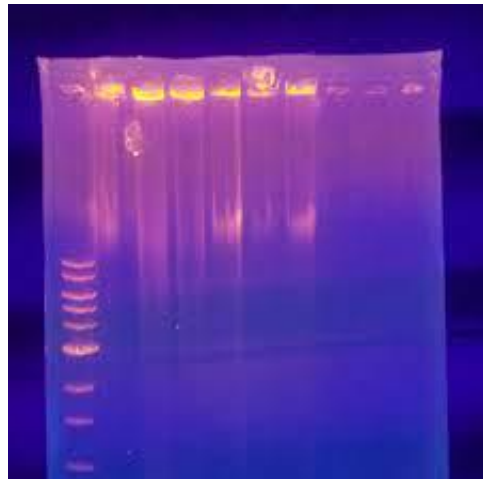
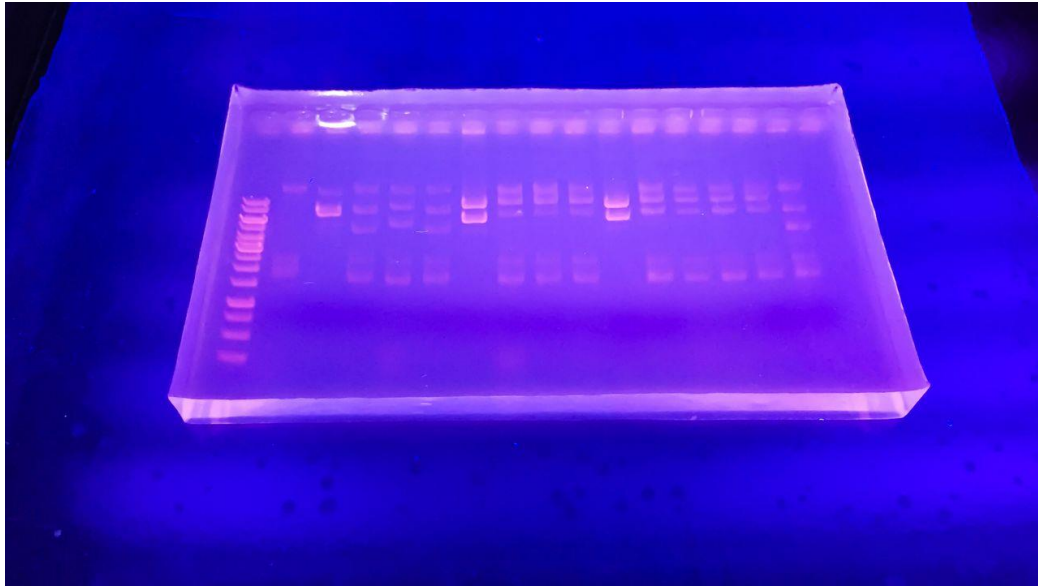


Gelová elektroforéza - agarózová

- **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



Gelová elektroforéza - agarózová



PCR – Polymerase Chain Reaction

13

- **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



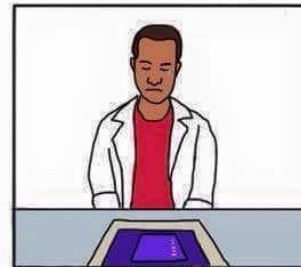
Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result



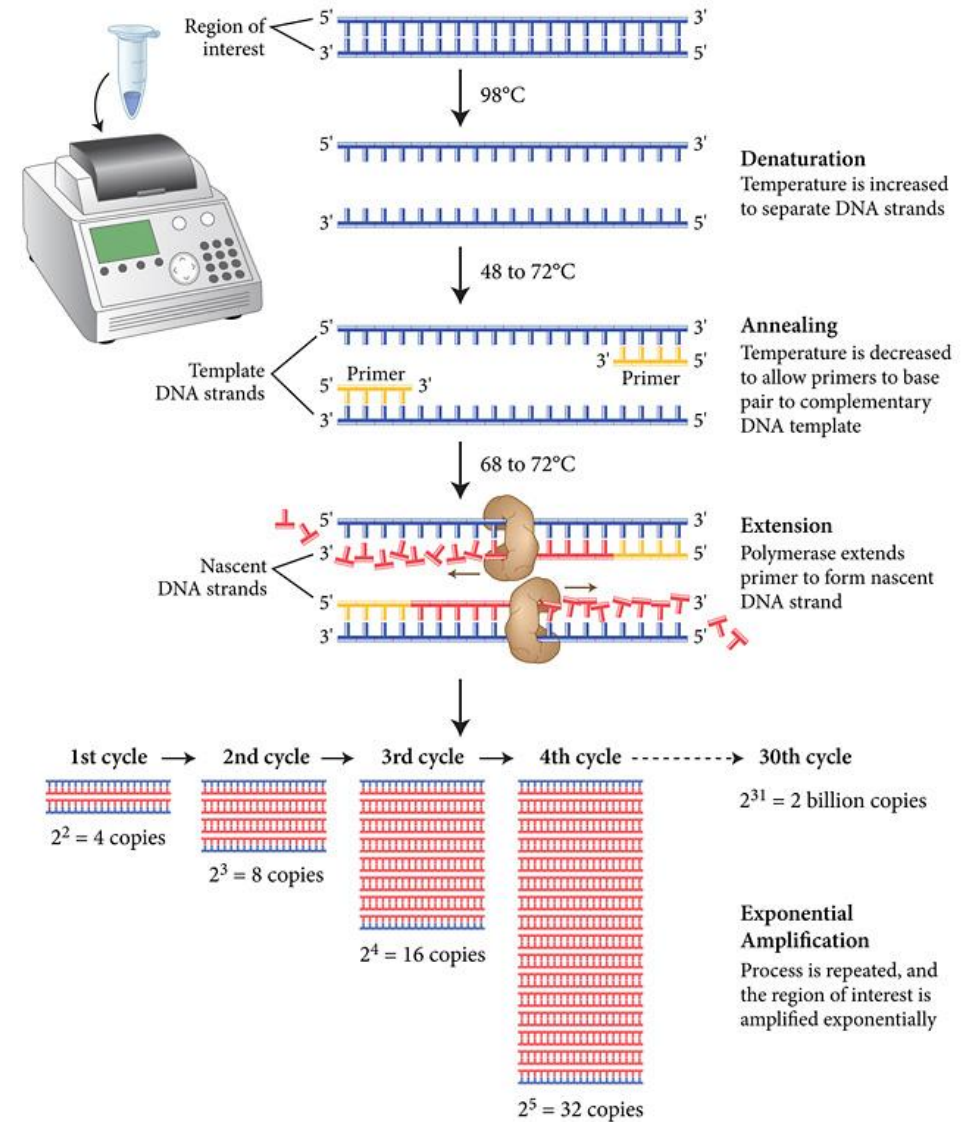
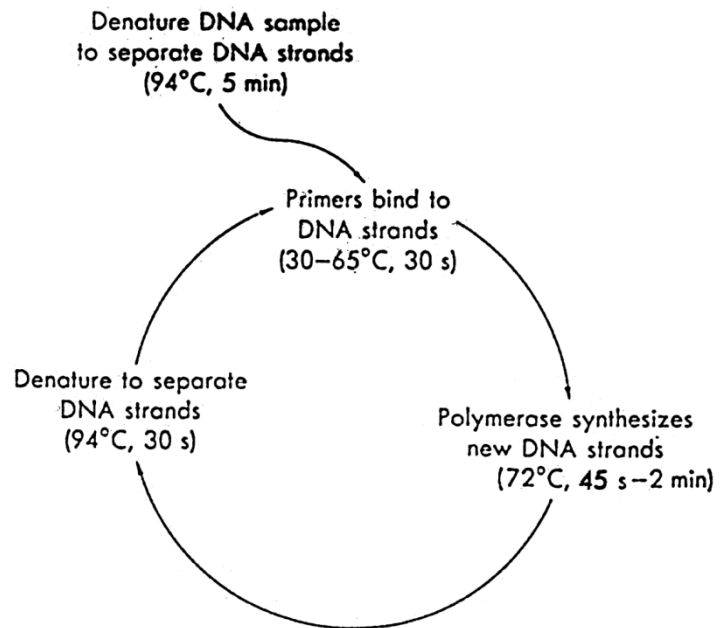
Cry



f Sketching Science

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**

- **pufř (pH=8)**

- **Mg²⁺ ionty**

- Ovlivňují aktivitu a přesnost polymerázy

- **primer**

- krátké specifické úseky DNA

- oligonukleotid 20–25 pb

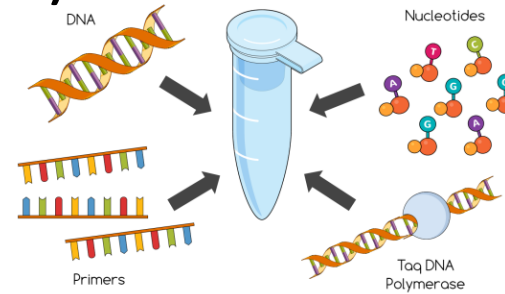
- ohraničení oblasti amplifikace DNA

- **DNA polymeráza**

- termostabilní (odolává teplotám až 98 °C)

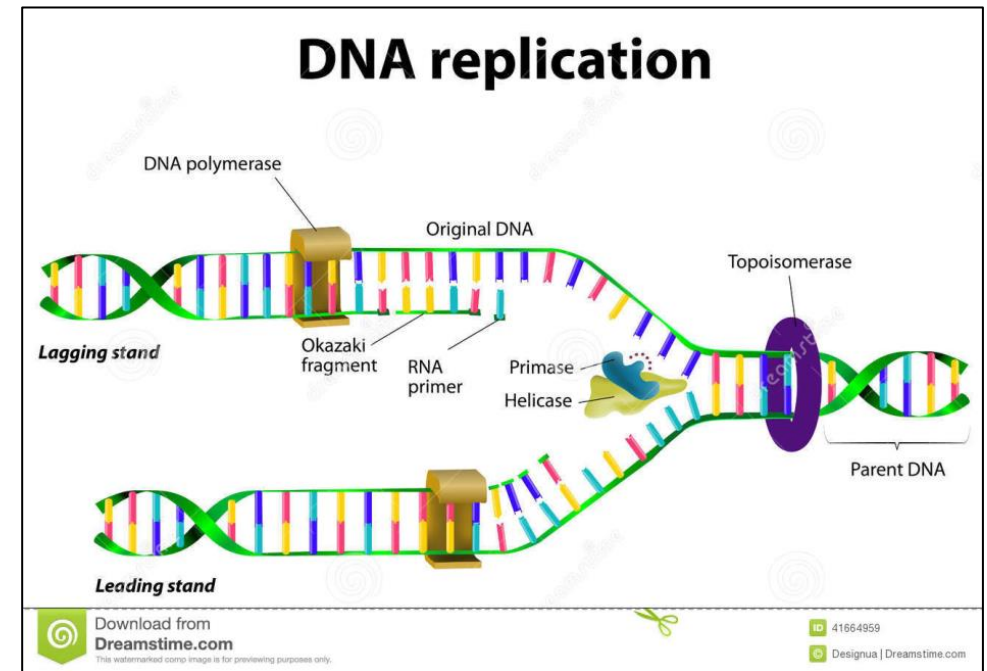
- Taq (*Thermus aquaticus*), Tth (*Thermus thermophilus*)

- **teplota**



- **DNA replikace – *in vivo***

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

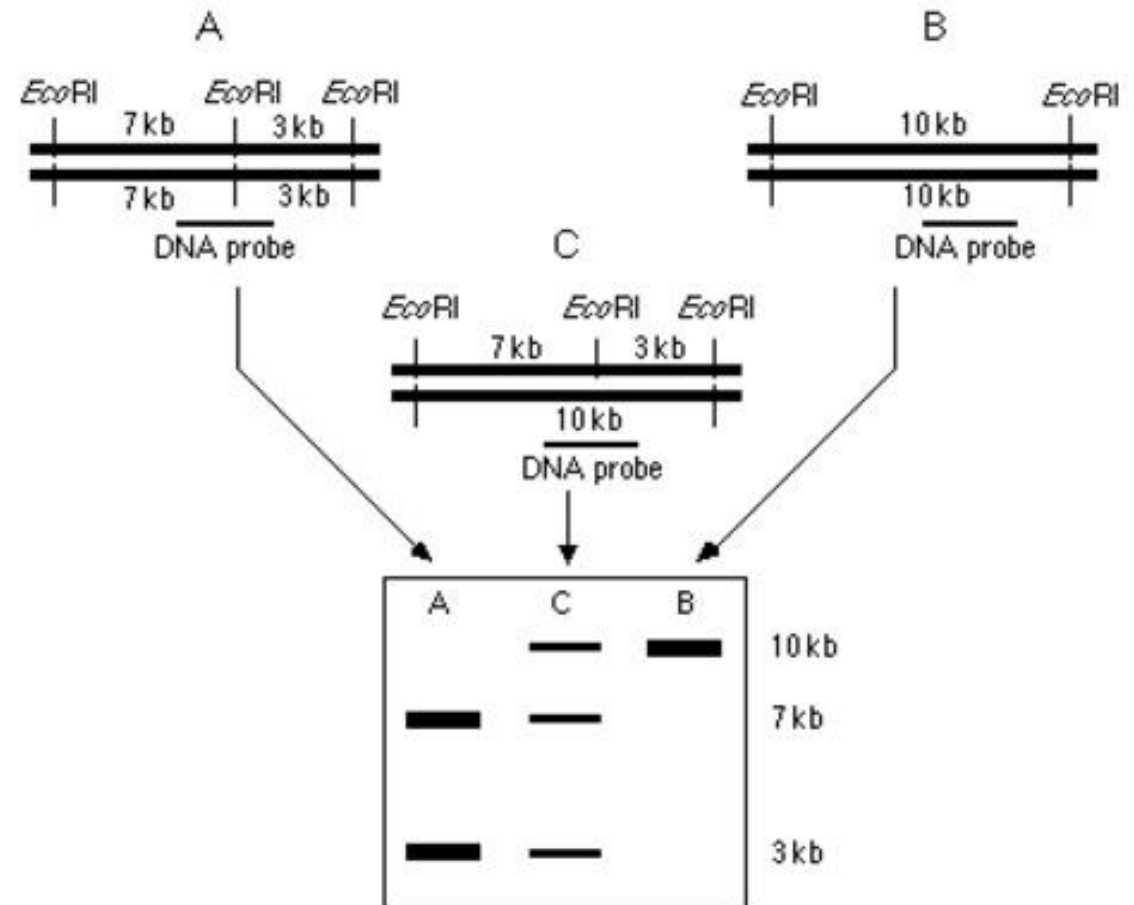


Video pro názornost: <https://www.youtube.com/watch?v=matsiHSuoOw>
a <https://www.youtube.com/watch?v=oqeV72oYfD0>

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

14

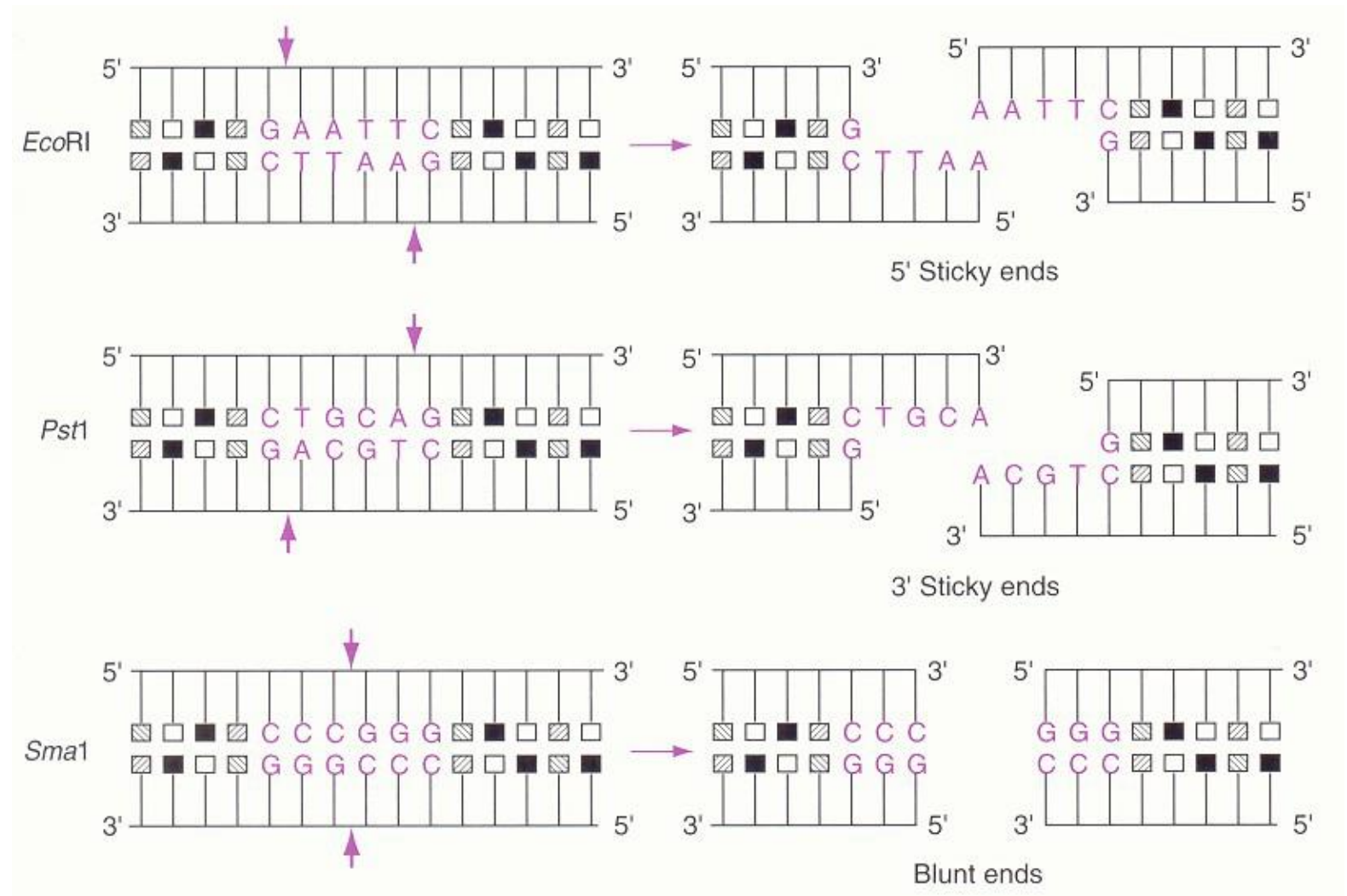
- Enzymatické štěpení DNA ve specifickém restrikčním místě
- **Restrikční endonukleázy**
- Produktem jsou fragmenty o různé délce
- Vzniklé fragmenty jsou separovány pomocí gelové elektroforézy
- **Využití:**
 - mapování DNA, analýza modifikací DNA, příprava mutantů
 - na základě velikosti a počtu fragmentů 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

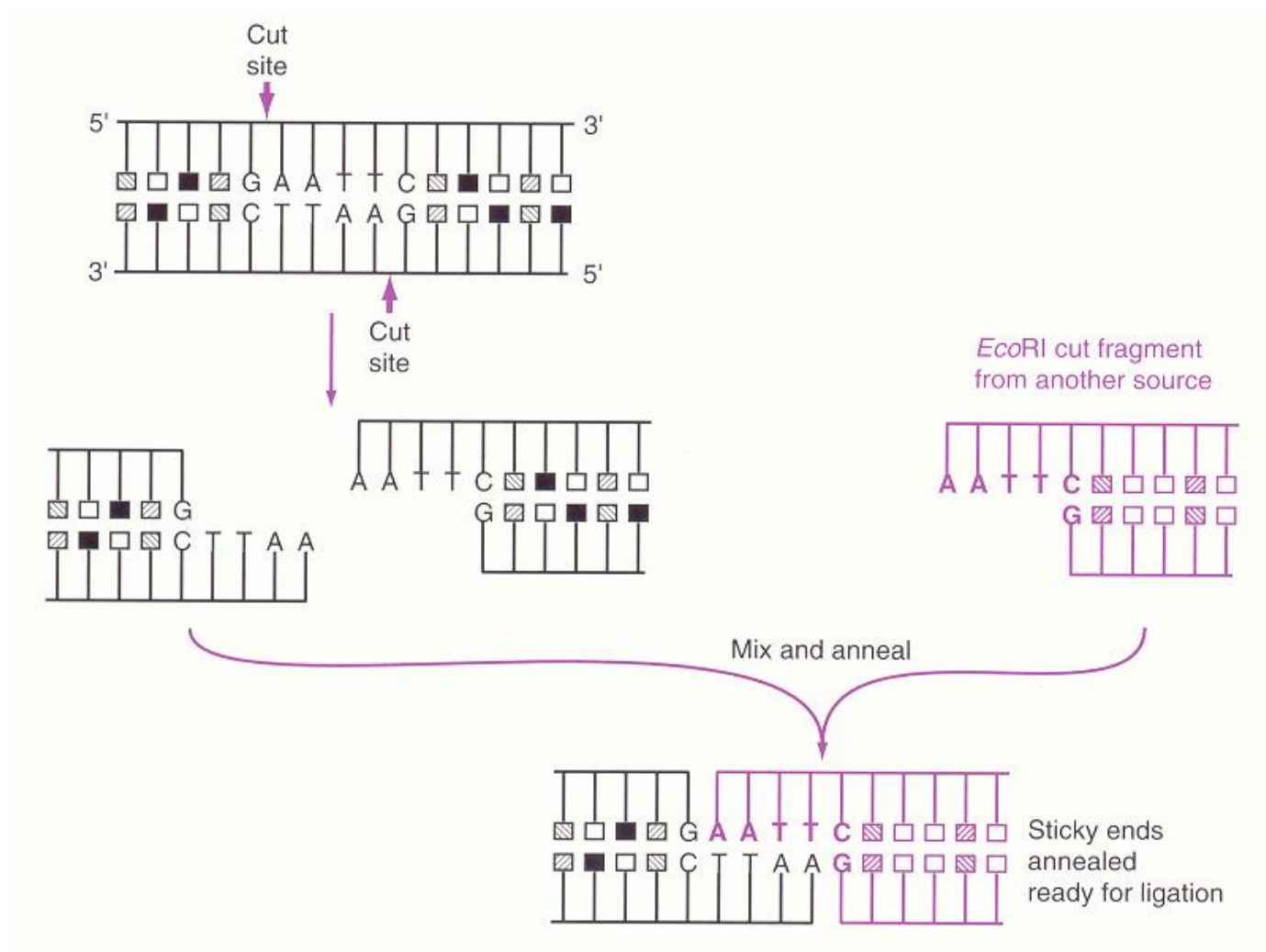
Palindrom

JelenoviPivoNelej

jelenoviPivoNelej

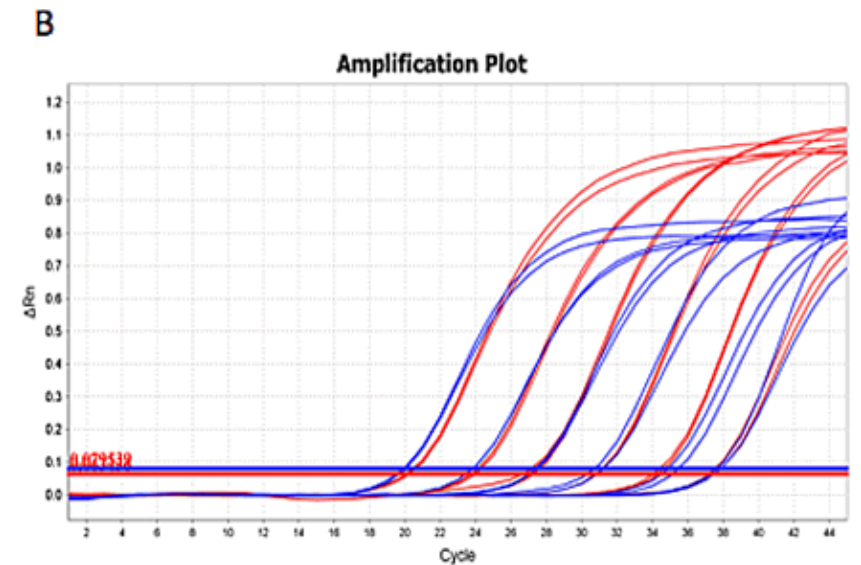
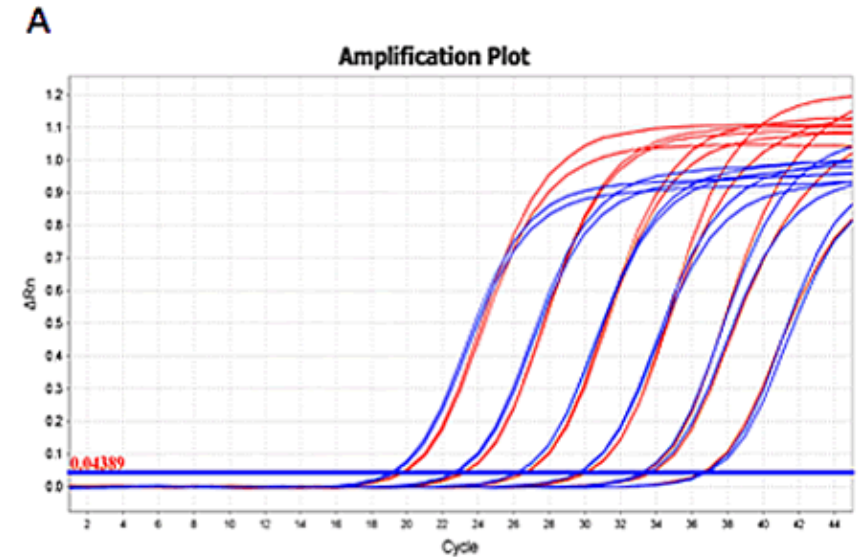
RFLP

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



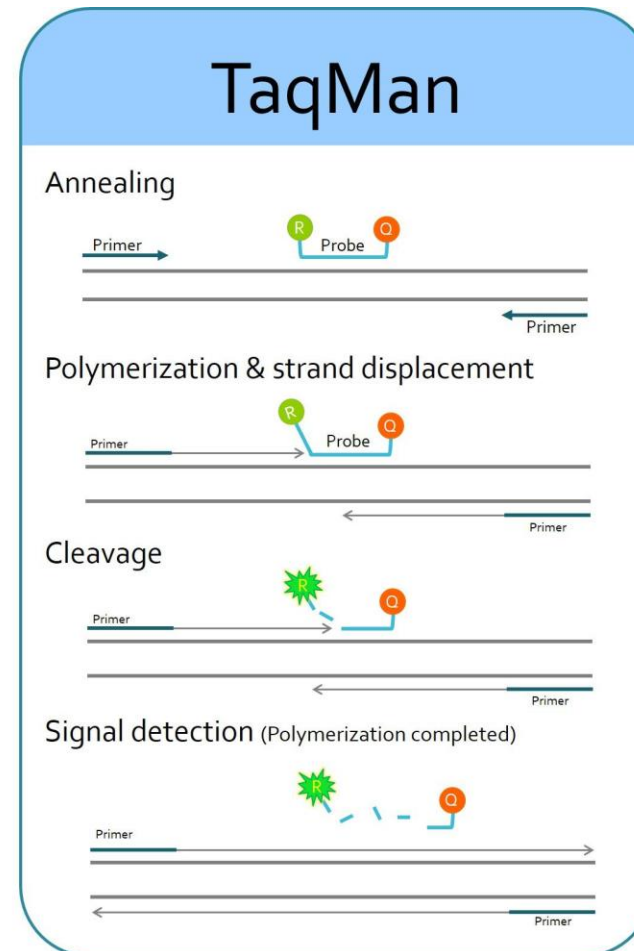
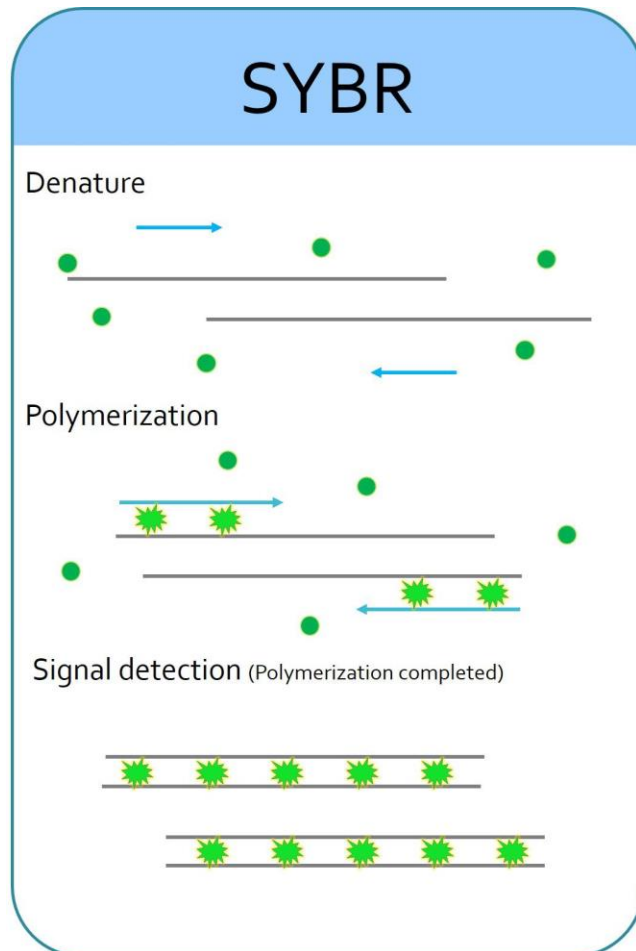
qPCR – Kvantitativní Real-time PCR

- 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** – nescificky se váže na dsDNA



- **sekvenčně specifická sonda** – krátký oligonukleotid s barvičkou a zhášečem (**TaqMan**) – po jeho rozpadu při syntéze DNA nárůst fluorescenčního signálu (využívá 5'-3' exonukleázovou aktivitu DNA polymerázy)

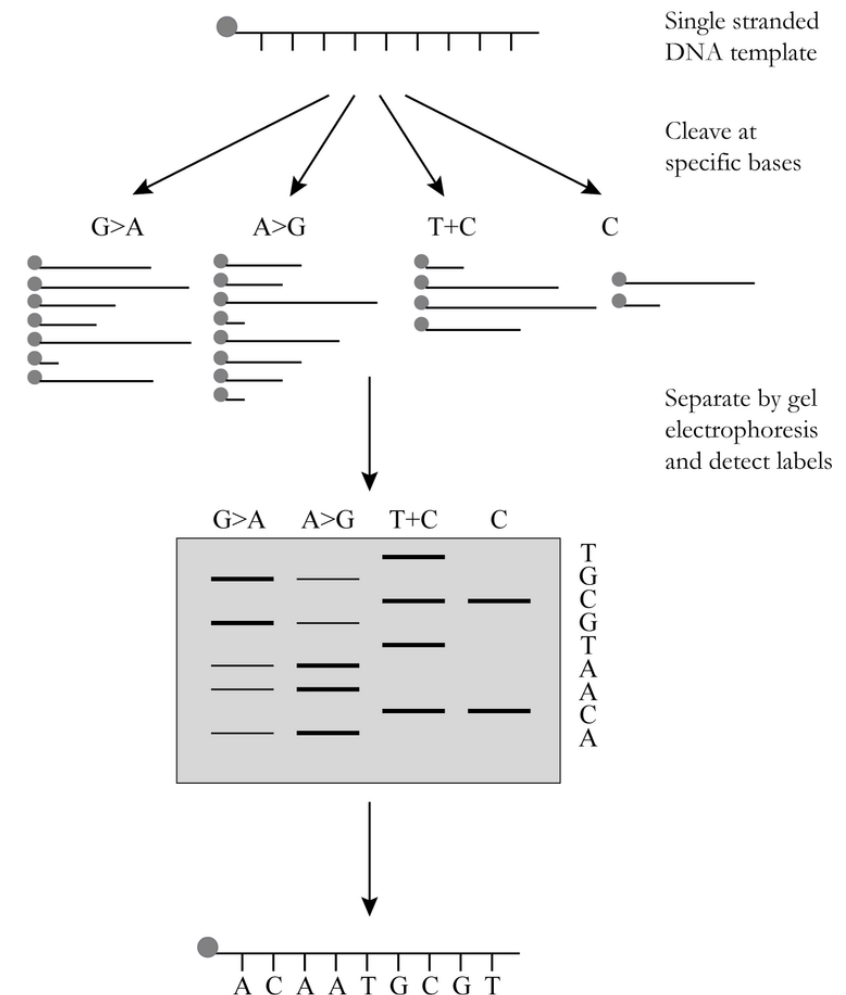
- Stanovení **primární struktury DNA** (pořadí nukleotidů)
 - a) chemická metoda** – dříve; degradace řetězců nukleových kyselin pomocí chemických činidel (dimethylsulfát, NaOH, hydrazin,..) – Maxam-Gilbertova metoda
 - b) enzymatická metoda** – specifická inhibice enzymové syntézy DNA (ddNTP) – Sangerova 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

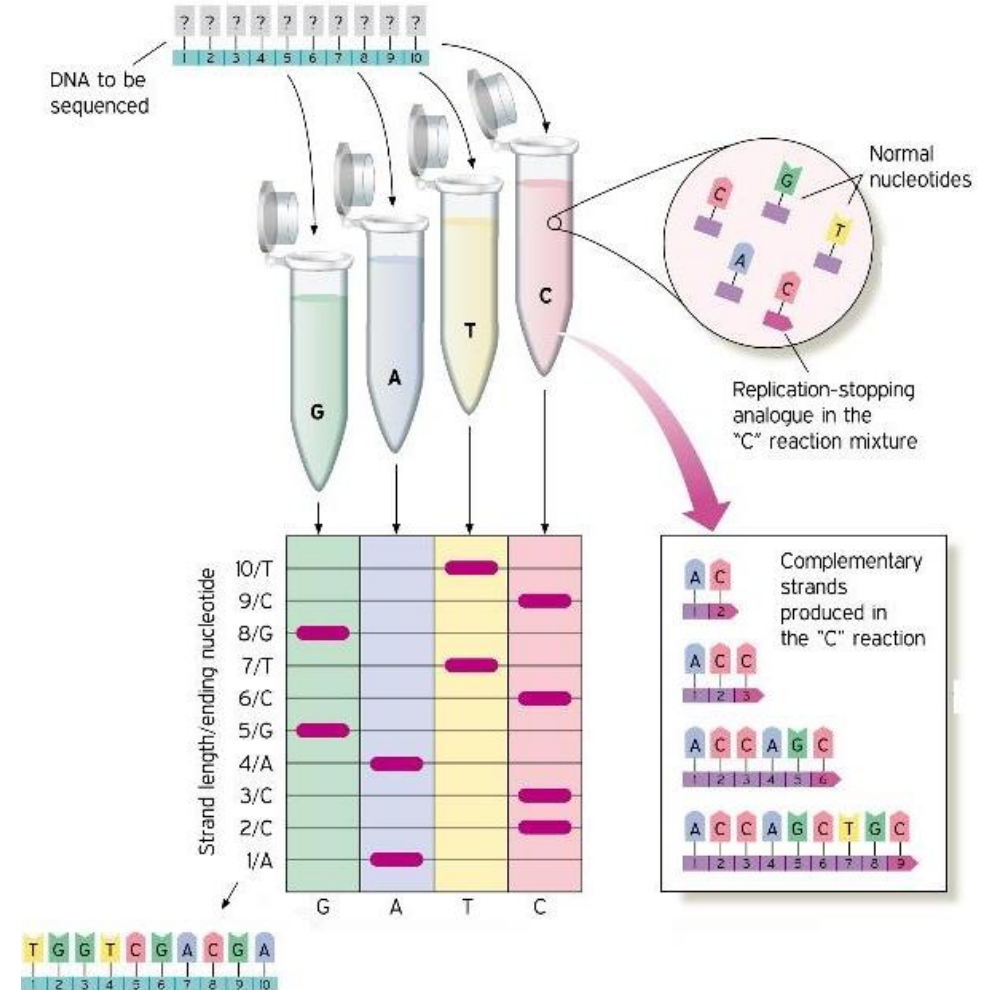
- Sekvence je odvozena z molekuly DNA, která se chemicky degraduje na fragmenty v místech, kde se vyskytuje báze určitého typu. Ty se následně separují pomocí elfo.
- **Chemická činidla** – příklad:
 - piperidin narušuje glykosidovou vazbu A a G (A + G)
 - hydrazin za přítomnosti NaCl reaguje pouze s 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

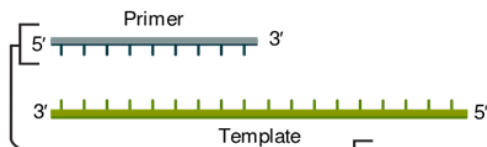


Sangerovo sekvenování

- Kapilární sekvenace DNA s fluorescenčně značenými ddNTP

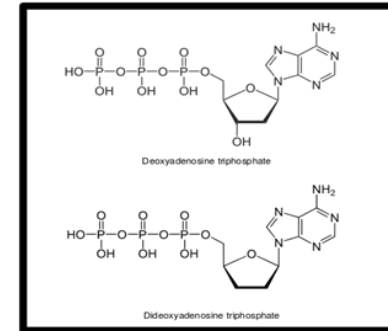
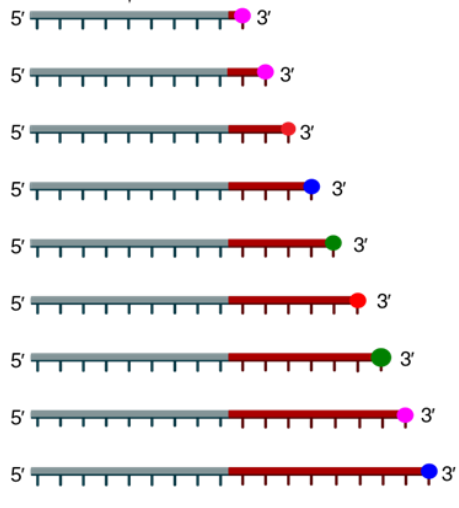
① Reaction mixture

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

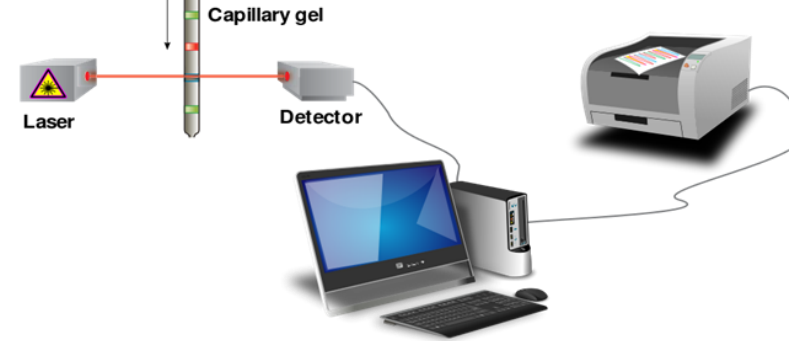


- ddNTPs
- ddTTP
- ddCTP
- ddATP
- ddGTP

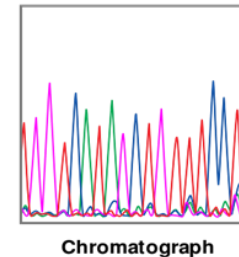
② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

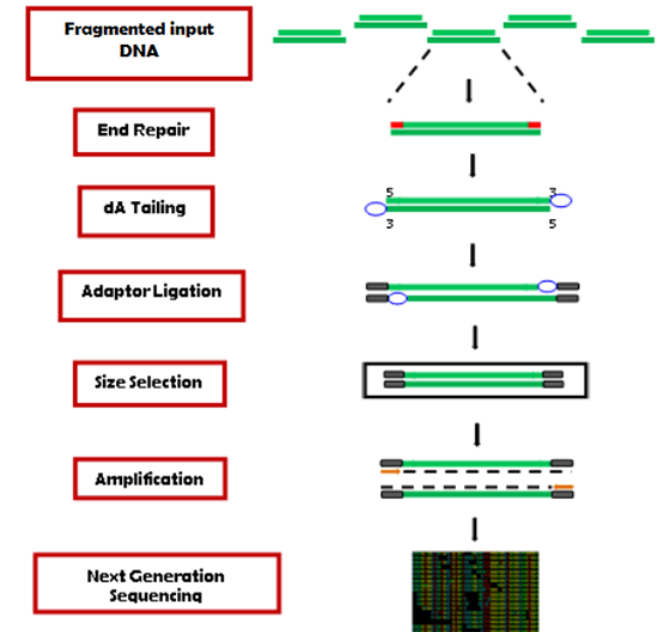


④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis

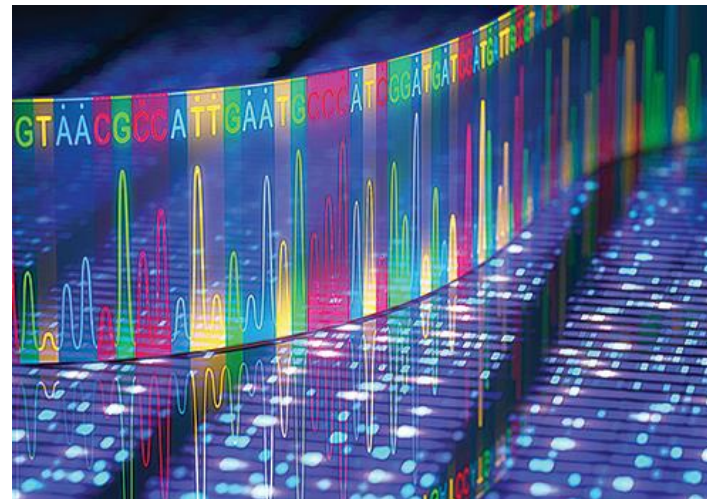


NGS – Next Generation Sequencing

- Sekvenování tisíců až milionů sekvencí současně
- Templátová DNA je fragmentována na úseky několik set bp dlouhé
- Konce fragmentů jsou enzymaticky zatupeny a napojeny k oligont určité sekvence (= adaptéry)
- Jednotlivé fragmenty jsou odděleně amplifikovány PCR a v dalším kroku paralelně sekvenovány



- Využití:
 - celogenomové sekvenování
 - sekvenování chromozomů, plazmidů, mt
 - studium genetické variability, mutační analýza
 - transkriptomová analýza



Video pro názornost:

<https://youtu.be/jFCD8Q6qSTM>

<https://www.youtube.com/watch?v=-kTcfZxP6kM>

Praktická část cvičení

PCR

1. Praktické provedení RFLP-PCR

Objem v mikrozkušavce: 18 μL

Složení (1 vzorek):

- PCR produkt (15 μL)

+

- TaqI (= enzym) (0,3 μL)
- Pufri pro TaqI (1,7 μL)
- PCR H₂O (1 μL)

MASTER MIX

1 kapka minerálního oleje

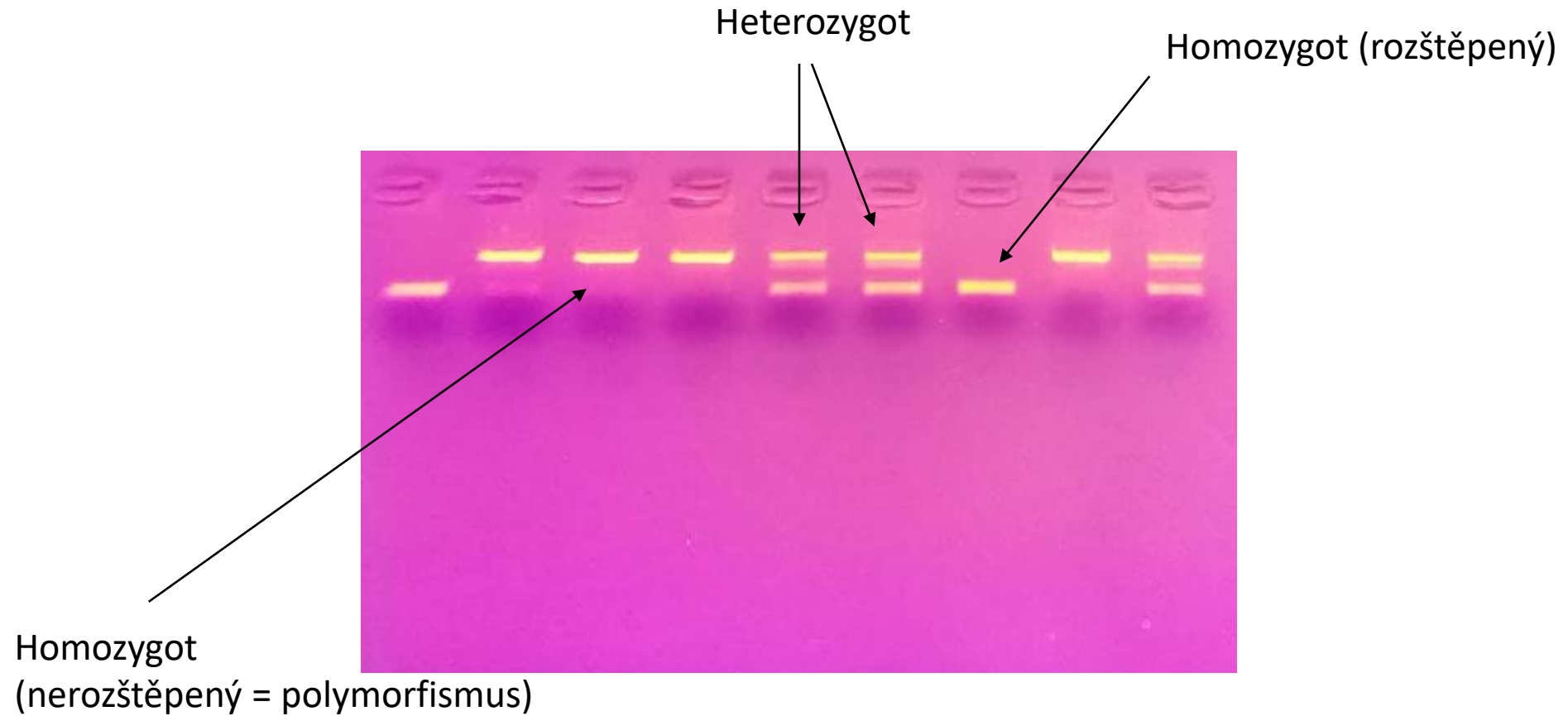


PCR cycler:

- 65 °C
- 4 hodiny (nebo over night)

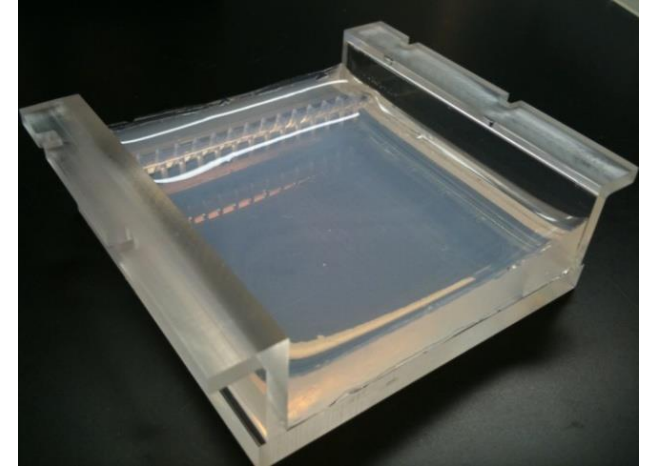
ELFO

2. ELFO restrikčních fragmentů po štěpení TaqI

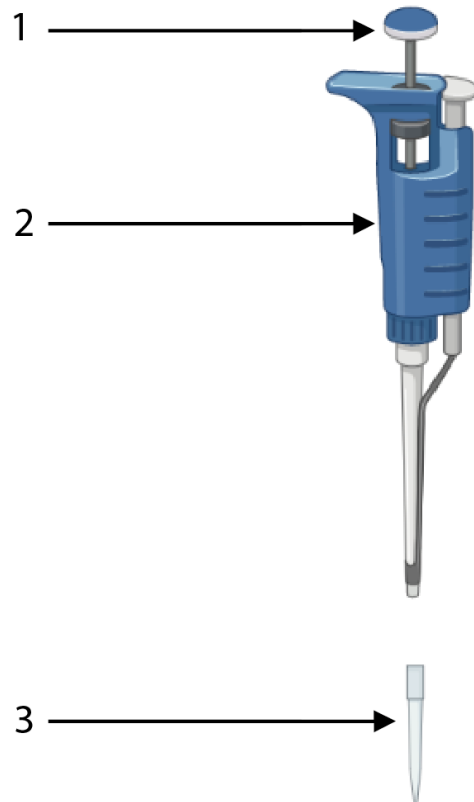


ELFO – praktické provedení

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 μ l / 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.

Video pro názornost:

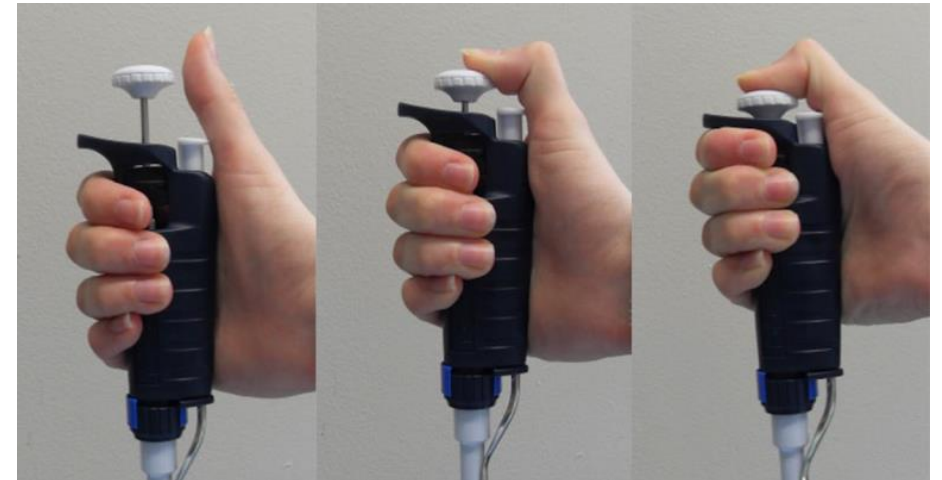
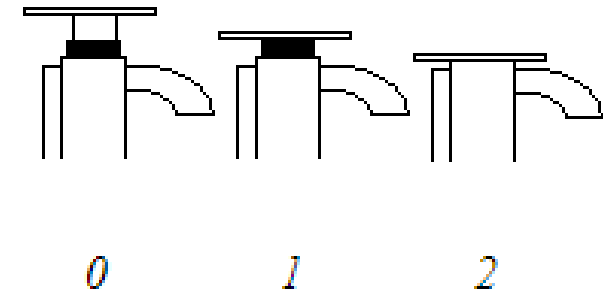
<https://www.youtube.com/watch?v=aSeod1Y5MRc>

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 **pomalů** 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:



Další metody

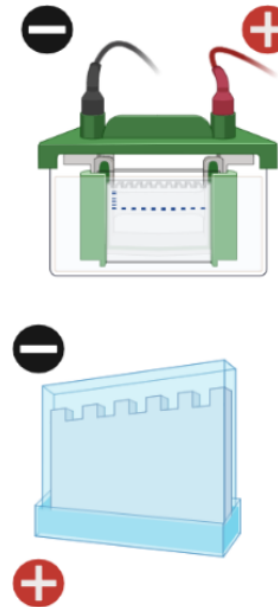
Western blot

- Kvalitativní nebo semi-kvantitativní detekce **proteinů**
- Princip – detekce proteinu v gelu v elektrickém poli s využitím vazby antigen-protilátka
- 3 fáze
 1. Elektroforetická separace proteinů (polyakrylamidový gel)
 2. Přenos separovaných proteinů
 3. Detekce proteinů

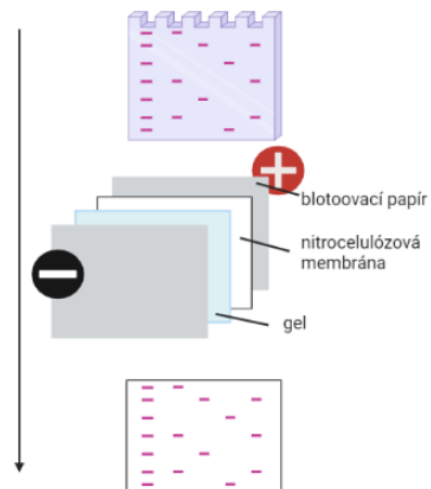
① Nanášení vzorků proteinů



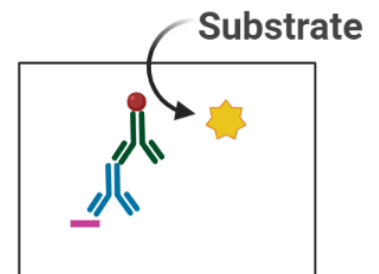
② Zapojení stejnosměrného proudu



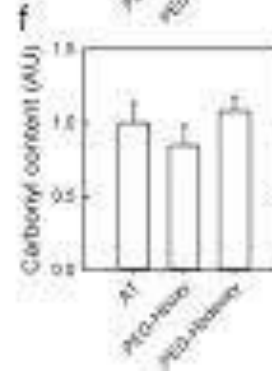
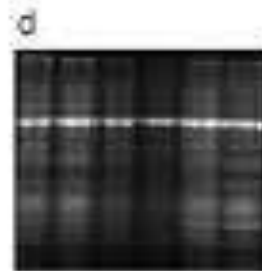
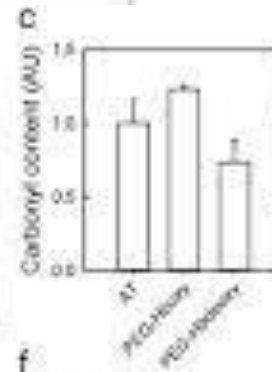
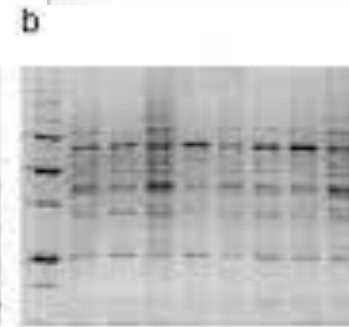
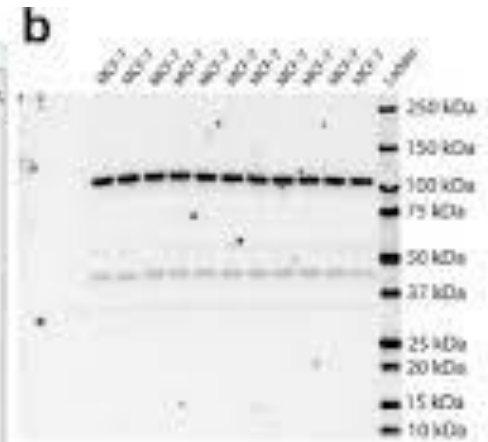
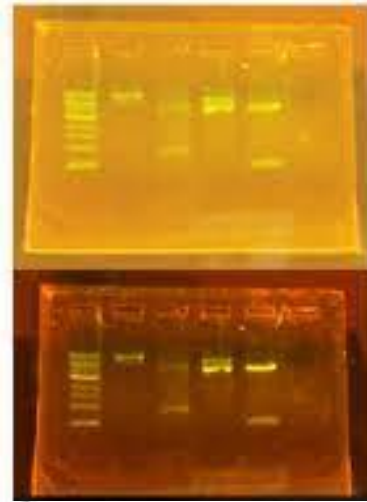
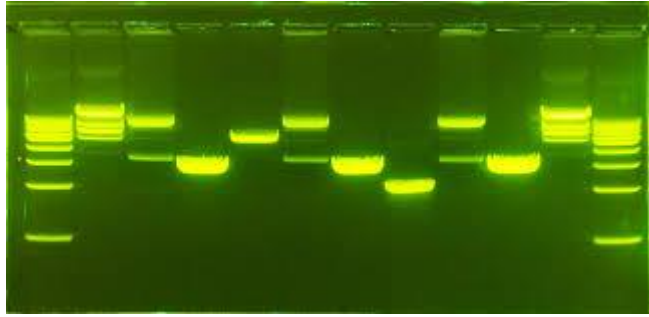
③ Transfer proteinů z gelu na membránu



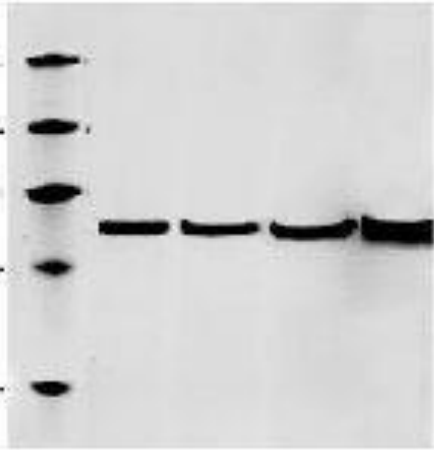
④ Detekce proteinů na membráně



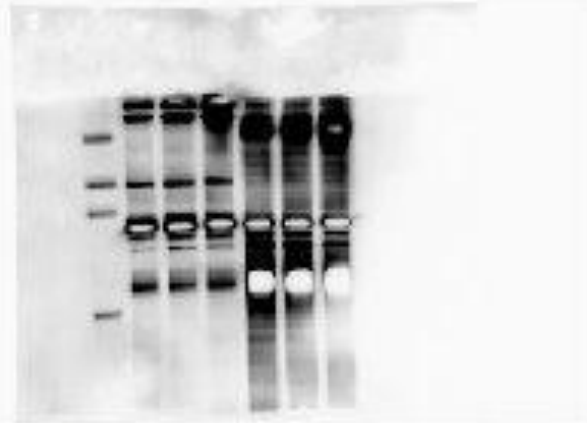
Gelová elektroforéza - ostatní



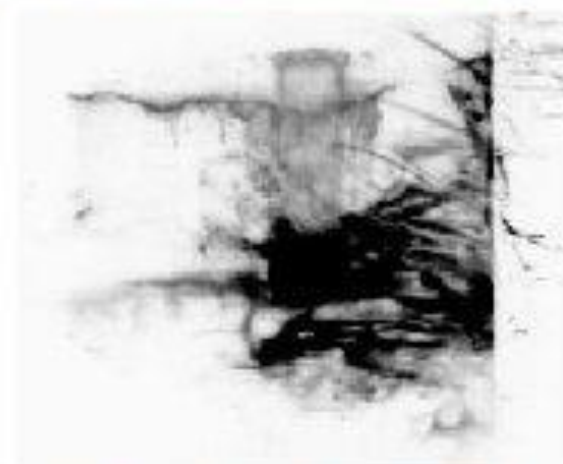
**THERE ARE THREE
KINDS OF WESTERNS...**



THE GOOD



THE BAD



AND THE UGLY

Děkujeme za pozornost