

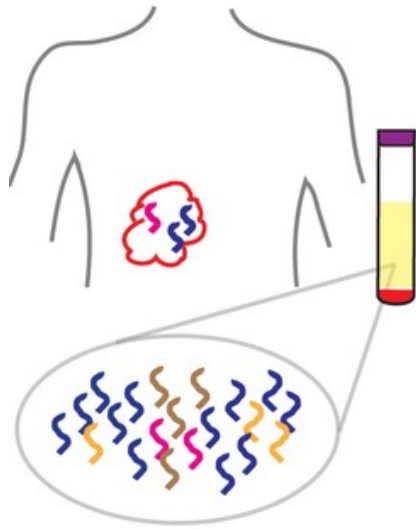
A close-up photograph of a hand holding a pipette tip over a multi-well plate. The background is blurred, showing laboratory equipment and colorful lights. The text "Metody molekulární biologie" is overlaid in yellow.

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





Práce s biologickým materiálem
 PLNÁ KREV - PLAZMA, SÉRUM ,SLINY, BUŇKY, TKÁŇĚ, TĚLNÍ TEKUTINY

Izolace DNA, RNA, PROTEINY

Detekce a Kvantifikace

DNA

Detekce polymorfismu a mutace

1. PCR (amplifikace konkrétního fragmentu)- RFLP (naštěpení spec. restrikčními enzymy) – detekce na ELFO
2. Real-Time PCR
3. Sekvenace

Analýza sekvence DNA

Klonování

Zásah do genové exprese

Epigenenom

metylace DNA

histonové modifikace

RNA - mRNA

Analýza genové exprese

- Nothern Blott
- Real-Time PCR

Analýza transkriptomu

MicroRNA

PROTEIN

Analýza proteinů

Imunohistochemické metody

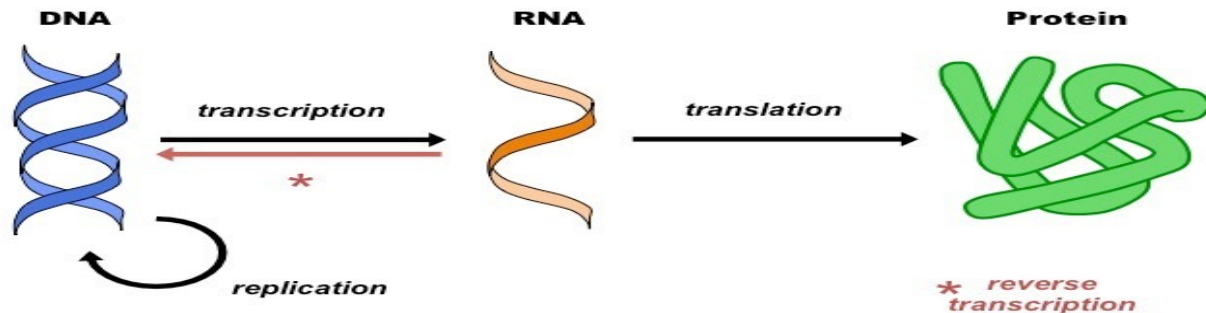
1. Western Blott
2. ELISA

Analýza proteomu

MS

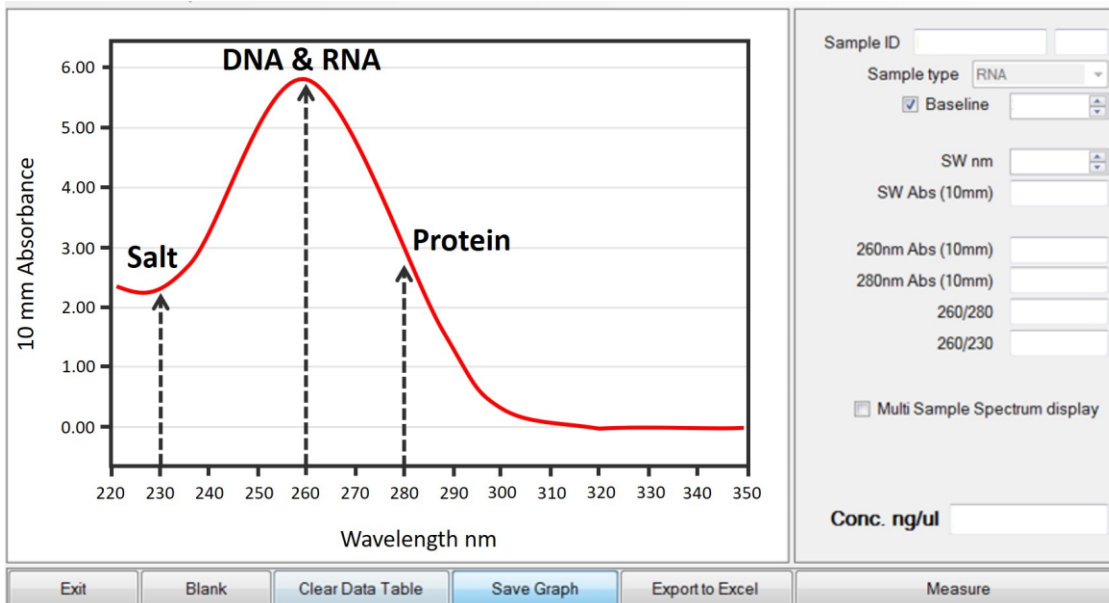
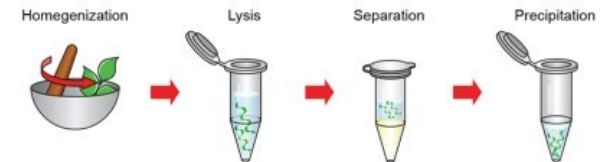
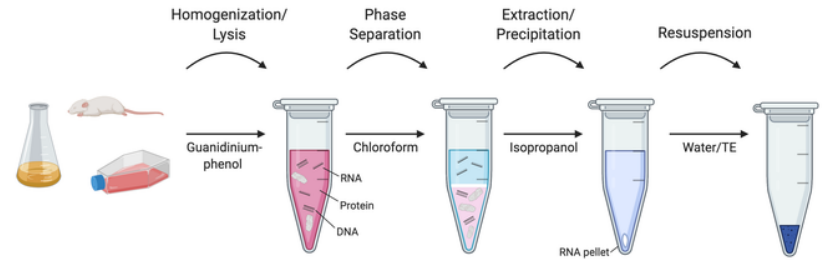
Analýza buněk

Průtoková flow-cytometrie



Izolace nukleových kyselin

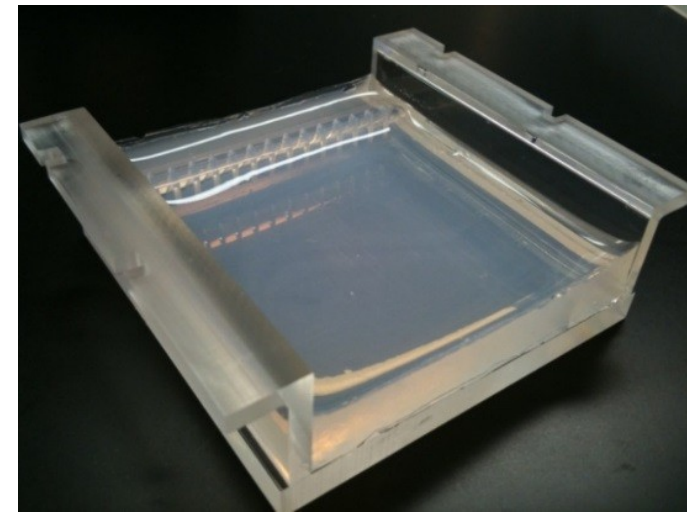
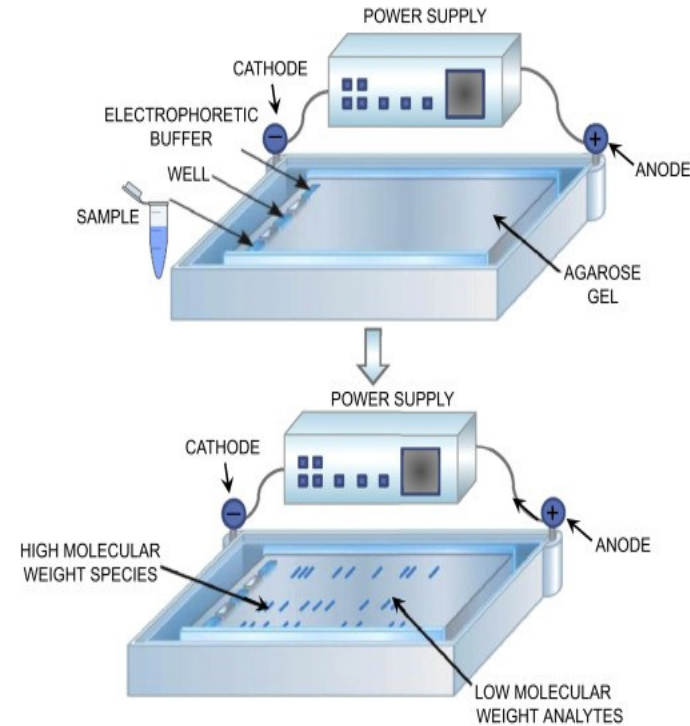
- V nativním stavu z přirozeného materiálu – v **dostatečném množství a požadované čistotě**.
- NK je potřeba zbavit všech všech látek, které se po lyzi buněk stávají součástí hrubého lyzátu a jejichž přítomnost by bránila účinnému specifickému působení enzymů používaných k dalším analýzám
- Izolace genomové DNA
- Izolace RNA – důraz na ochranu před degradací
- **Stanovení koncentrace a čistoty DNA/RNA**
– Spektrofotometrie
- **Kontrola kvality a integrity - ELFO**

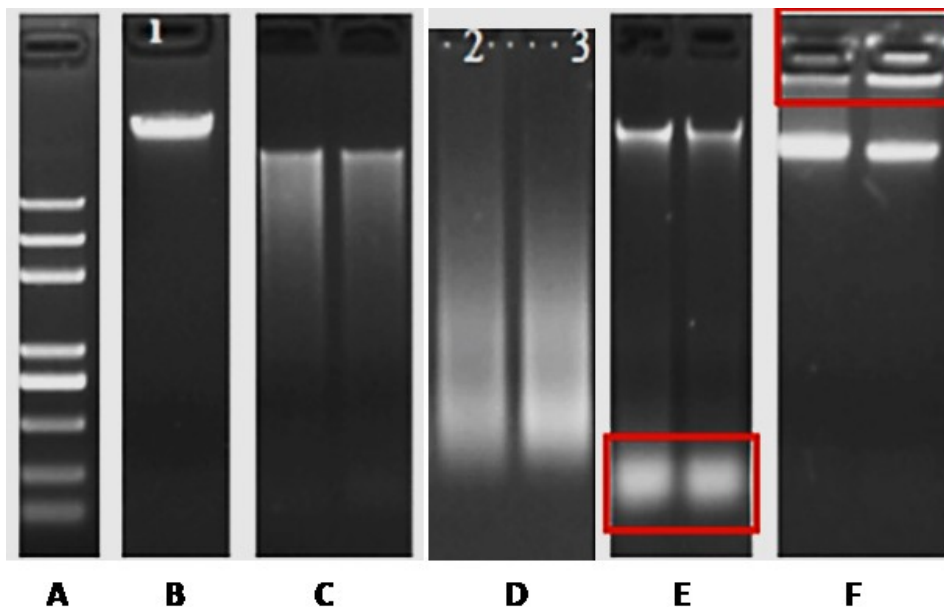
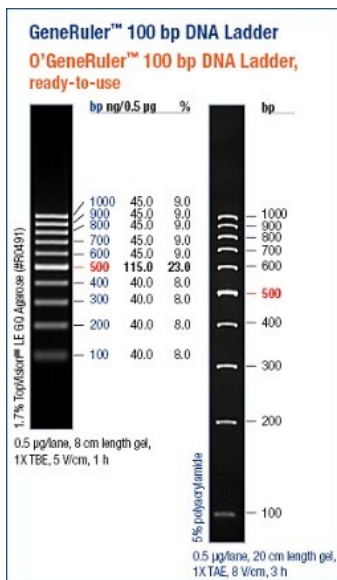


Gelová elektroforéza - agarózová

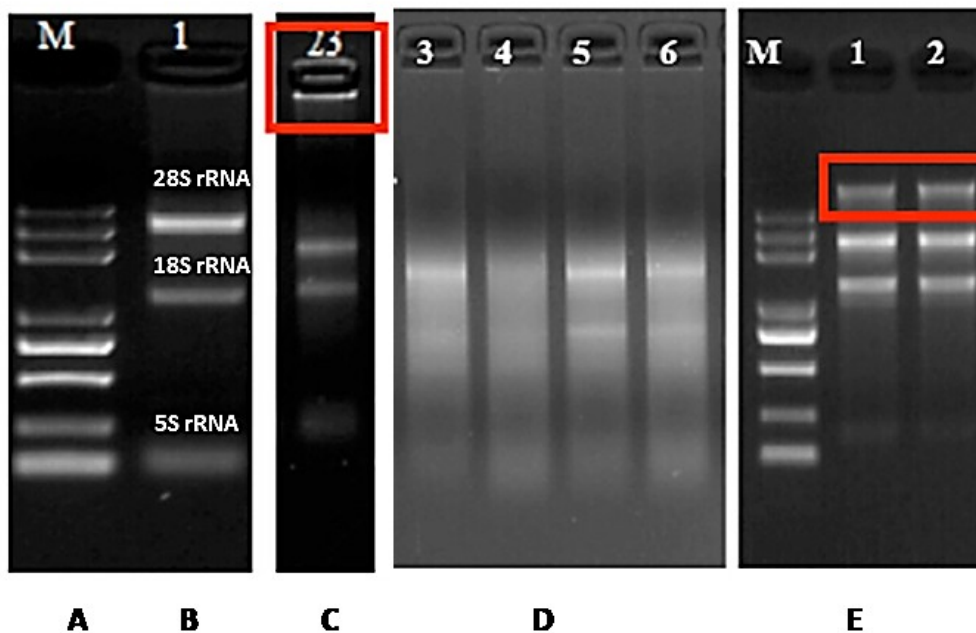
- **Separační metoda využíváná při izolaci a analýze NK (a proteinů = polyakrylamidová elfo)**
- **Izolující molekuly o rozdílné hmotnosti, popř. odlišném elektrickém náboji, využívající jejich odlišnou pohyblivost v elektrickém poli**
- **agarózová** (produkt mořských řas – agar)/polyakrylamidová
Gely tvoří hustou síť, kterou větší molekuly procházejí pomaleji než menší molekuly –technika **molekulového síta**
- **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**
- EtBr – vmezeří se mezi báze, zviditelní DNA pod UV (po vazbě na DNA pod UV emituje oranžové světlo)
- Velikost fragmentu DNA lze stanovit dle hmotnostních standardů (= restrikční fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž velikost byla stanovena sekvenováním)

Části **aparatury**: elektroforetická vana, separační gel, pufr, zdroj stejnosměrného elektrického proudu





- (B) **Ideální vzorek DNA**
 (C) Částečně degradovaná DNA
 (D) Degradovaná DNA
 (E) DNA kontaminovaná RNA (degradovaná)
 (F) DNA kontaminovaná proteinem

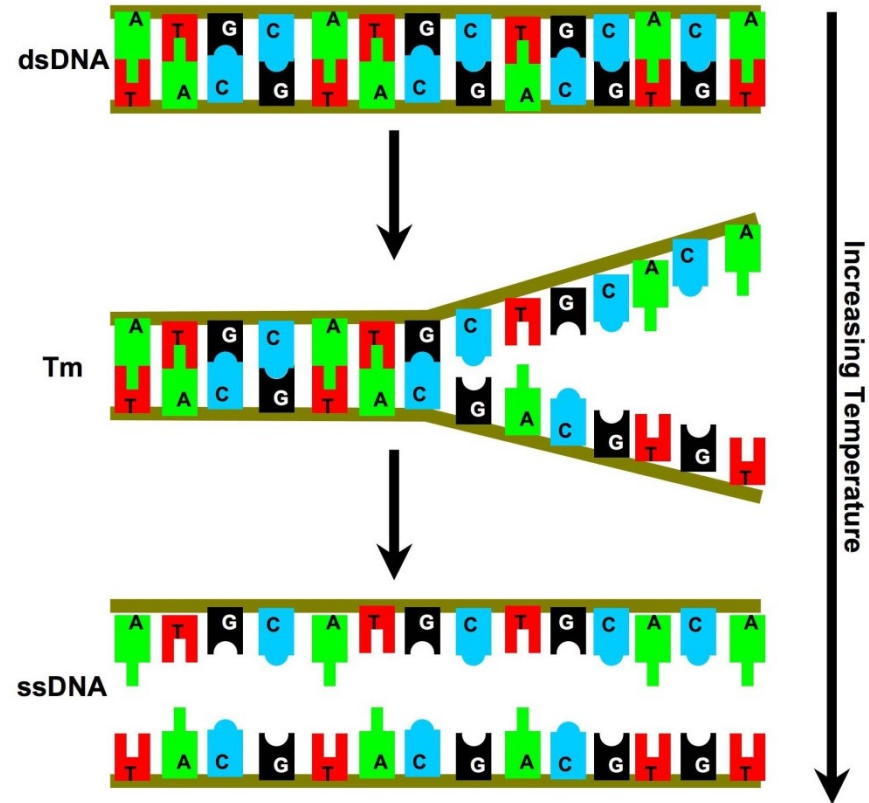


- (A) Trans2K™ Plus DNA Marker (0,1 kb- 5 kb)
 (B) **Ideální vzorek RNA**
 (C) RNA kontaminovaná DNA a proteinem
 (D) Degradovaná RNA
 (E) RNA kontaminovaná gDNA

*Ribosomální RNA migruje v agarózovém gelu rychleji než stejně velký fragment DNA, a proto při použití DNA žebříčku nelze určit skutečnou velikost 28/18/5S rRNA

PCR – Polymerase chain reaction

- Amplifikace vybraného úseku **DNA**
- Mnohonásobná in vitro replikace ve zkumavce
 - řetězová reakce vychází z DNA replikace
- Kary Mullis, 1983
- **DNA řetězce duplexu může být denaturována a znovu spojena**
- DNA replikace **in vivo** vyžaduje **několik enzymů**
 - separace řetězců
 - syntéza krátkých RNA primerů
 - syntéza dvou nových DNA helixů
- DNA replikace **in vitro** vyžaduje **pouze jeden enzym** (1957 Arthur Kornberg dokázal existenci DNA Polymerázy)



FUNKCE OSTATNÍCH PROTEINŮ JE in vitro NAHRAZENA ZMĚNOU TEPLOT !

• **komponenty PCR:**

templátová DNA

dNTP

pufř (pH=8)

Mg²⁺ ionty (aktivita a přesnost polymerázy)

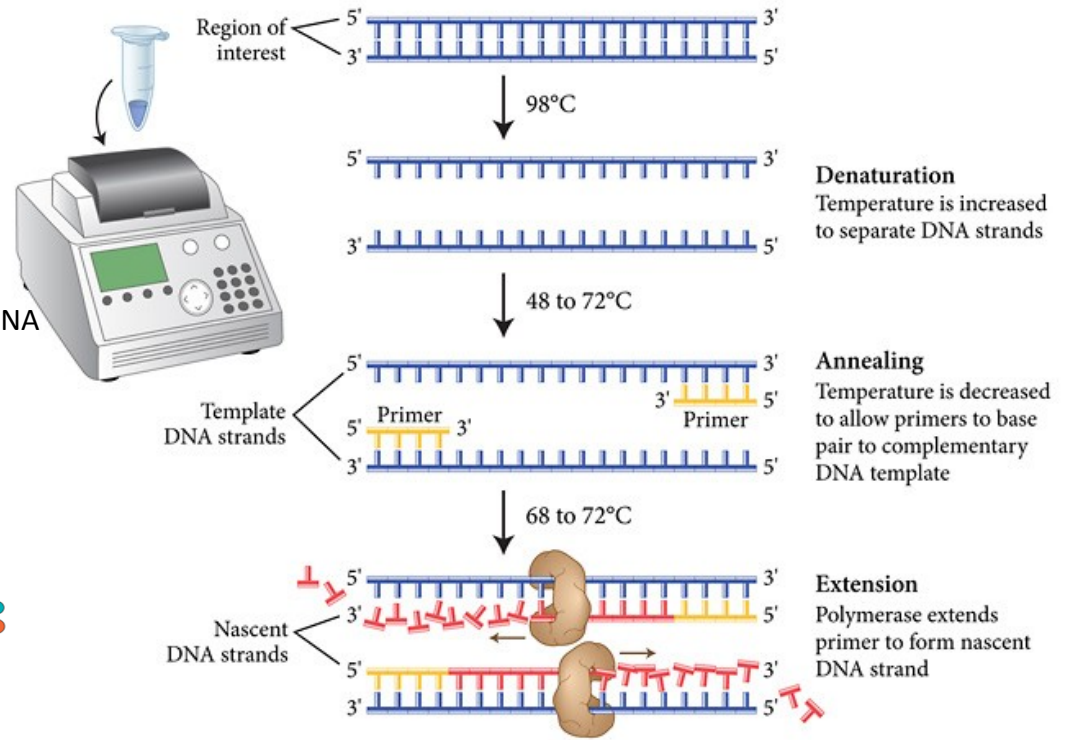
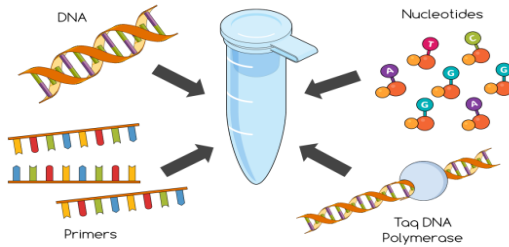
Primer - krátké specifické úseky DNA,
oligonukleotid 20–25 pb, ohraničení oblasti amplifikace DNA

DNA polymeráza

termostabilní (odolává teplotám až 98 °C)

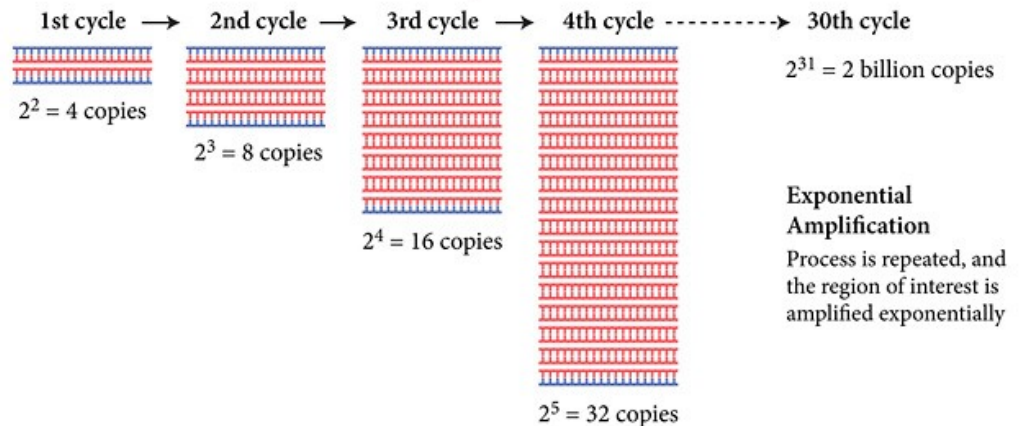
Taq (*Thermus aquaticus*), Tth (*Thermus thermophilus*)

teplota



• **opakování cyklů:**

- denaturace (separace dsDNA)
- navázání primerů
- elongace primerů
- syntéza nového vlákna DNA

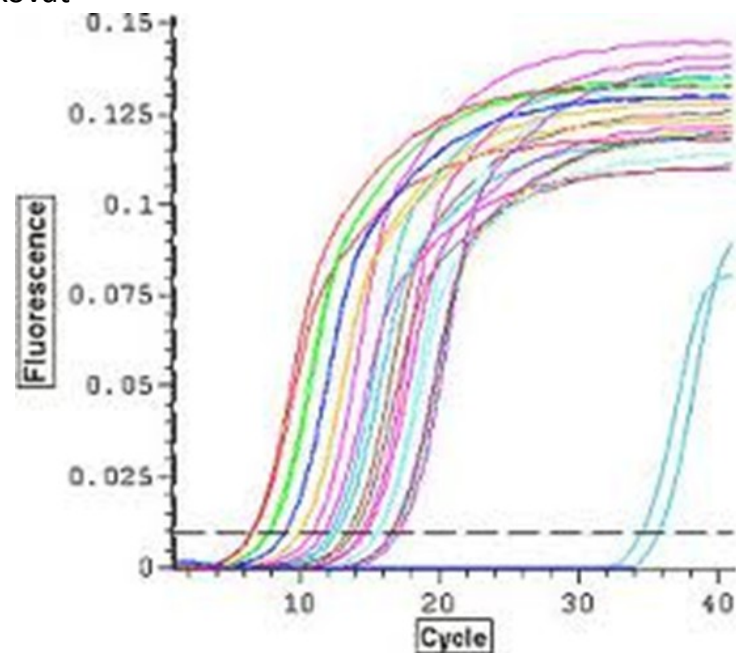


Exponential Amplification
Process is repeated, and the region of interest is amplified exponentially

pomocí změn teploty!

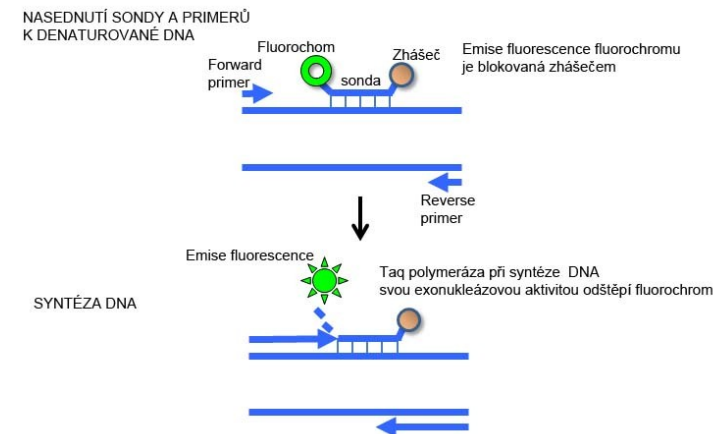
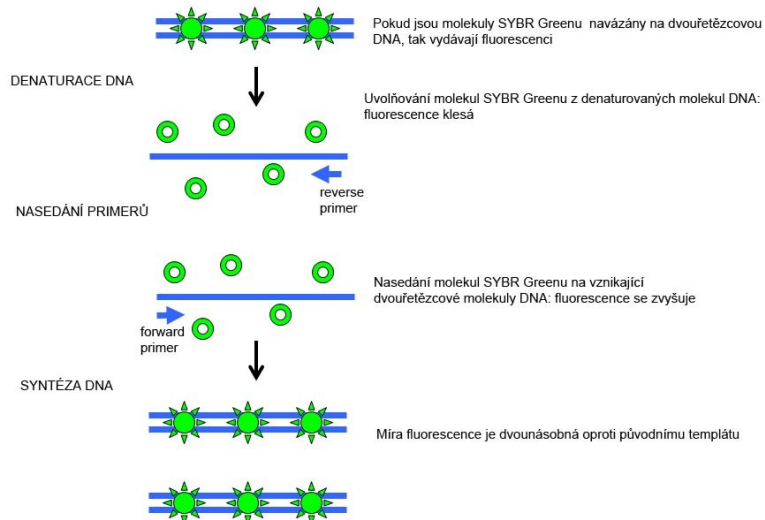
qPCR – Kvantitativní Real-time PCR

- **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 zhášečem (TaqMan) – po jeho rozpadu při syntéze DNA nárůst fluorescenčního signálu (využívá 5' -3' exonukleázovou aktivitu DNA polymerázy)



Využití:

kvantifikace genové exprese
kvantifikace patogenů
genotypizace

Video pro názornost: <https://youtu.be/YhXj5Yy4ksQ>

qPCR v Diagnostice

Monogenní onemocnění

**Detection of Thalassemia, hemophilia, Sickle cell anemia & favism*

**Cystic fibrosis*

**Phenylketonuria*

Forezní medicína

Prenatální daignostika

**Noninvasive Prenatal Diagnosis by Analysis of Fetal DNA in Maternal Plasma.*

Virologie

Diagnostika patogenů

**Quantitatively measurment of Human Immunodeficiency Virus (HIV).*

**Detection and Quantitation of Circulating Plasmodium falciparum DNA.*

**Effect of antimicrobial peptides on host cells*

Cystic fibrosis

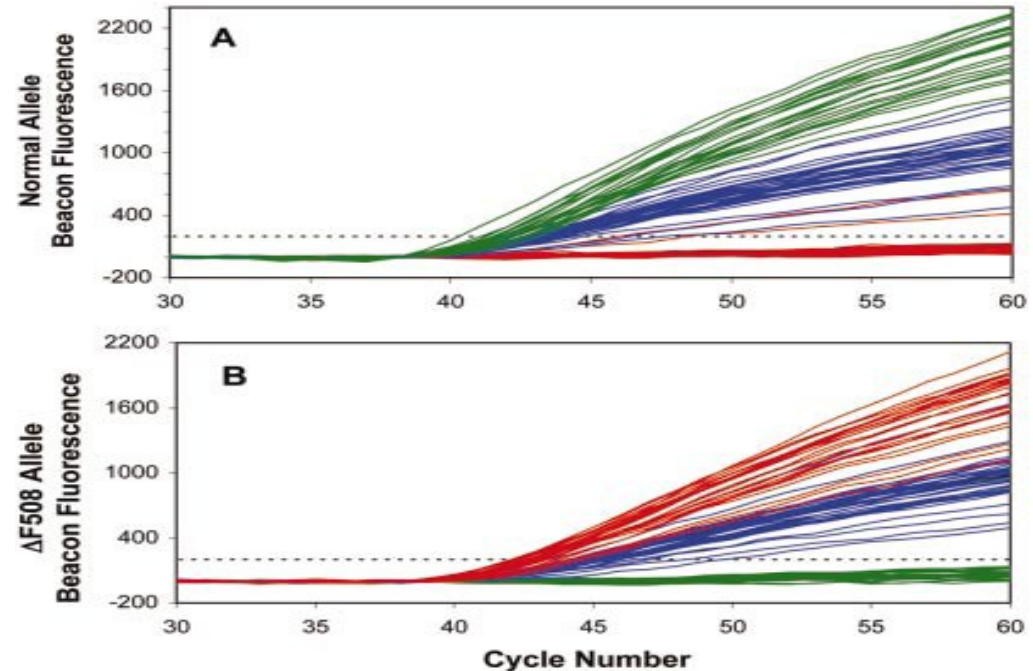


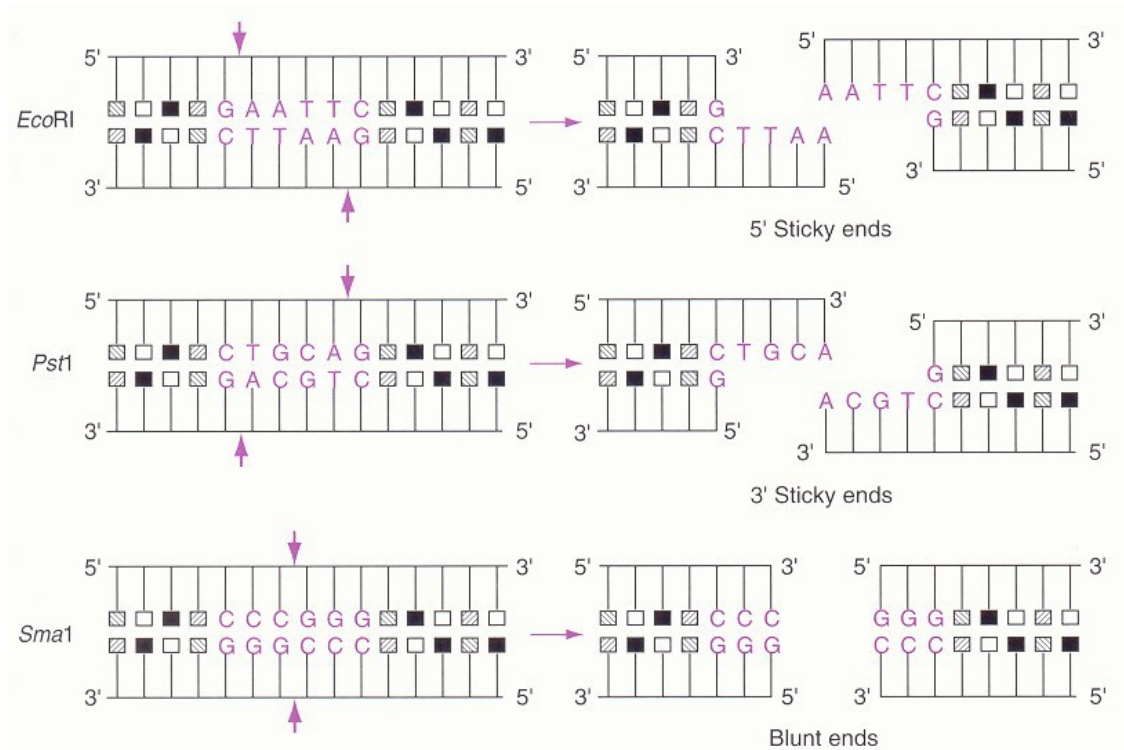
Figure 1. Examples of specific molecular beacon fluorescence increase during real-time PCR in samples containing single lymphoblasts homozygous normal for CF (green), heterozygous DF508 (blue), or homozygous DF508 (red). (A) Fluorescent signal from the molecular beacon detecting the normal allele. (B) Fluorescent signal from the molecular beacon detecting the DF508 allele. Dashed lines indicate the threshold of 200 units (~ 10 SD above baseline readings) used for determining CT values.

Restrikční enzymy

Restrikční endonukleáza

(Meselson and Yuan 1968, Smith and Wilcox 1970)

- 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

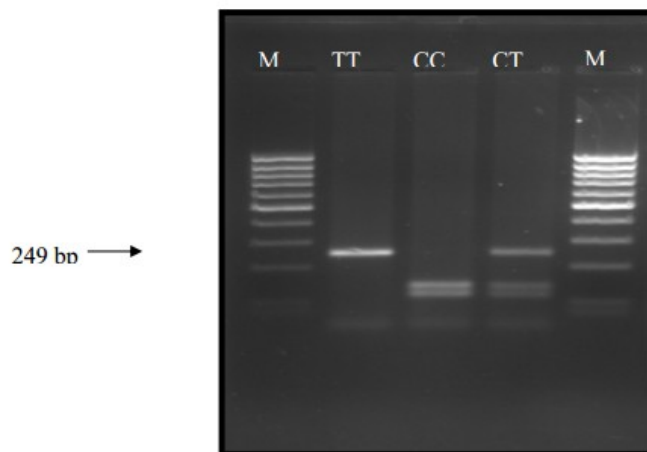
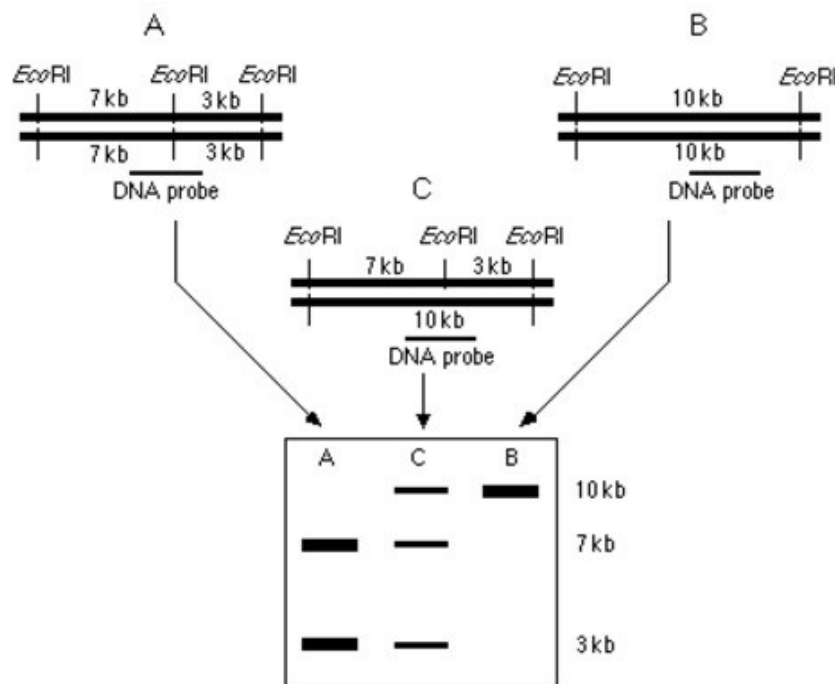


RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

- Enzymatické štěpení DNA ve specifickém restričním místě
- **Restriční 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
- Neštěpená TT
- Štěpená CC
- Heterozygot CT



Restrikční endonukleázy

tvorba rekombinantních DNA

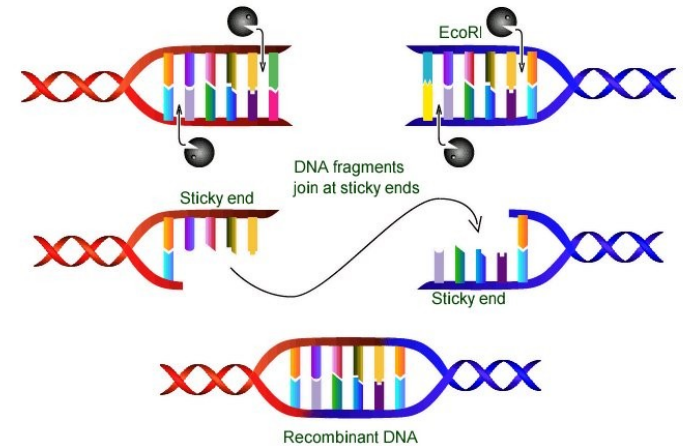
přečnívající kompatibilní konce usnadňují spojení různých fragmentů DNA

- hormon Protropin® (Genentech, 1985)
- interferon α Roferon A® (Hoffmann-La Roche, 1986)
- první rekombinantní vakcína proti hepatitidě B Recombivax® exprimovaná v kvasince *Saccharomyces cerevisiae* (Merck, 1986)
- první přípravek založený na monoklonální protilátce Orthoclone OKT 3 (Janssen-Ortho, 1986)(Cvak a Fusek, 2004).
- 2006 - registrováno 1452 biotechnologických firem v USA
- tetraivalentní vakcína proti lidskému papilomaviru (HPV) s názvem Gargasil, Silgard , 2006

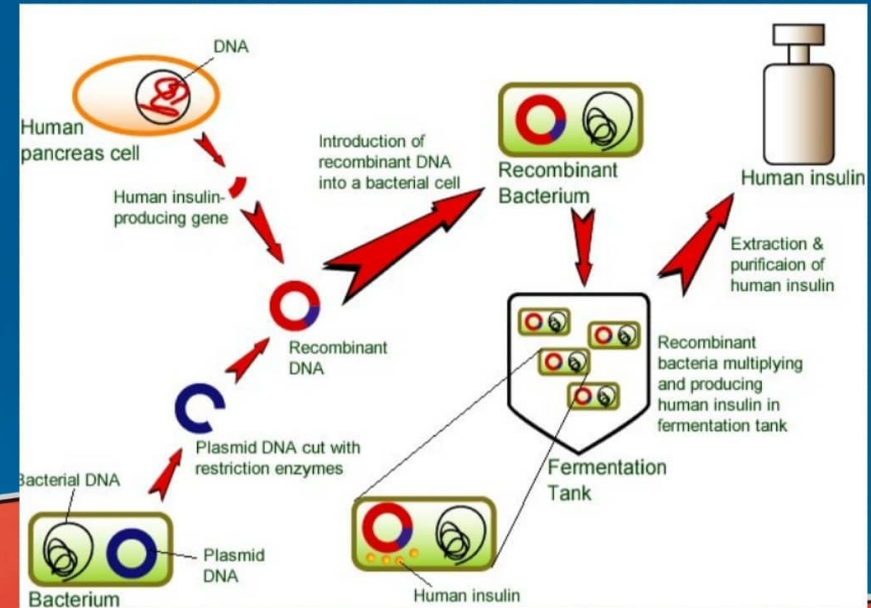
tvorba GMO

- bakterie mění DNA (Agrobakterie) rostliny, aby ta dělala, co ony potřebují
- 1986, schválena první první transgenní rostliny – tabáku nesoucího vložený gen pro rezistenci k herbicidu. Environmental Protection Agency, c USA
- 70 % dnes pěstované bavlny je geneticky modifikovaných

Restriction Enzyme



HUMULIN PRODUCTION



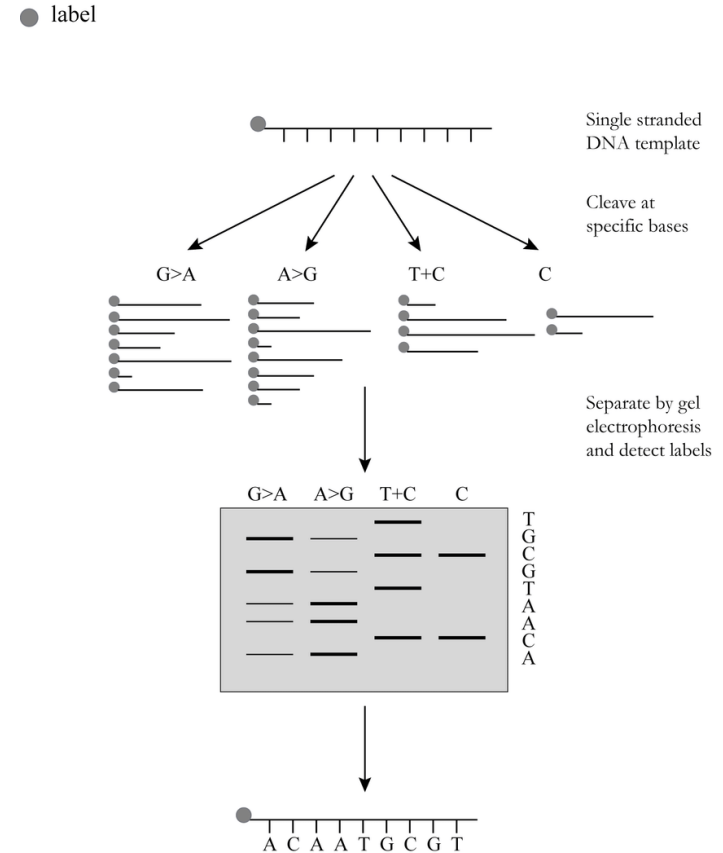
Sekvenace DNA

- 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 bazí.
- Vzniká směs různě dlouhých fragmentů končících v místě určité báze → vyhodnocení pomocí elfo, stanovena sekvence daného úseku.

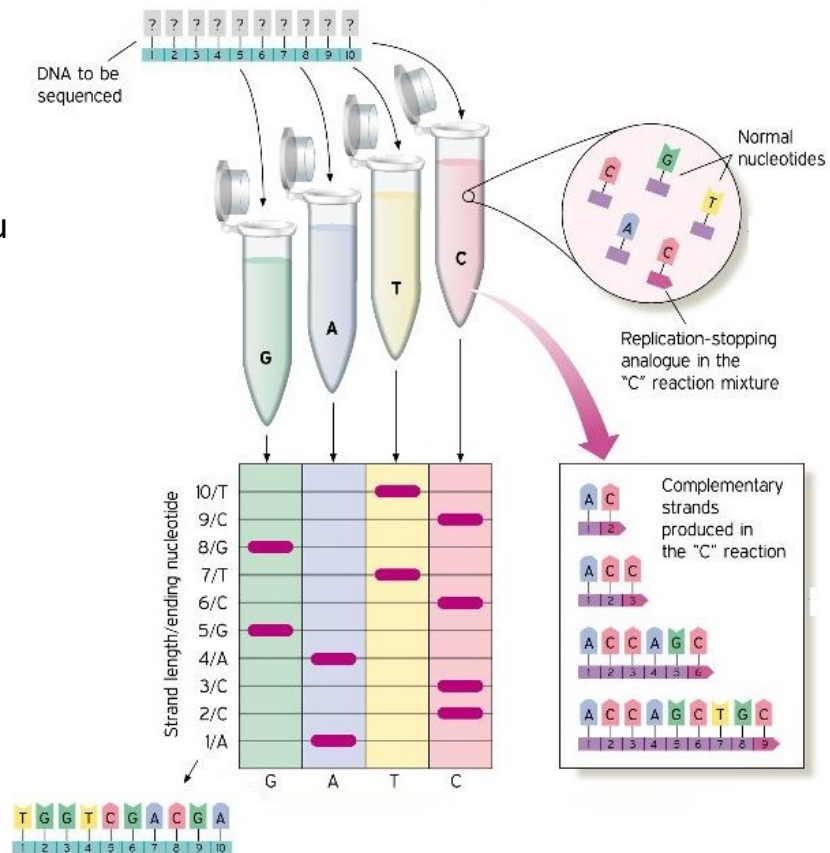


Video pro názornost:

<https://www.youtube.com/watch?v=B5Dj8PL4E0>

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



Video pro názornost:

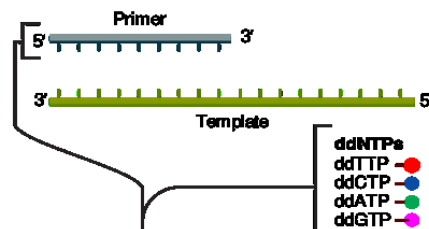
<https://www.youtube.com/watch?v=wds3j0TgbjM>

Sangerovo sekvenování

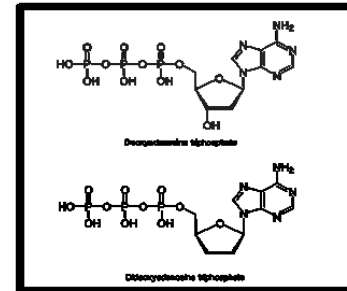
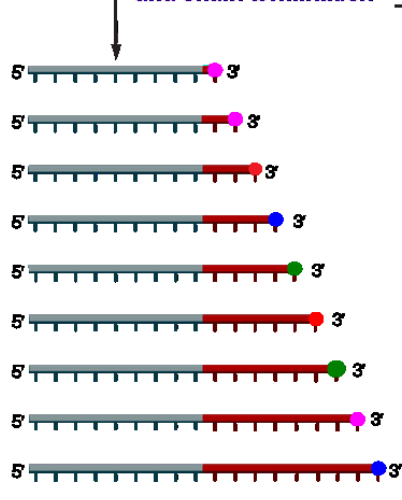
- Kapilární sekvence DNA s fluorescenčně značenými ddNTP

① Reaction mixture

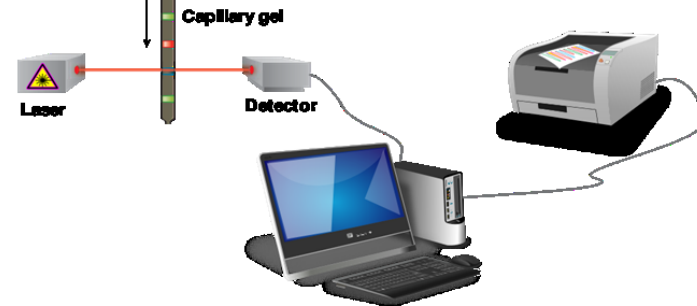
- ▶ Primer and DNA template
- ▶ DNA polymerase
- ▶ ddNTPs with flouochromes
- ▶ dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP)



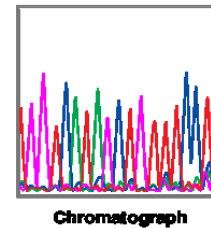
② Primer elongation and chain termination



③ Capillary gel electrophoresis separation of DNA fragments

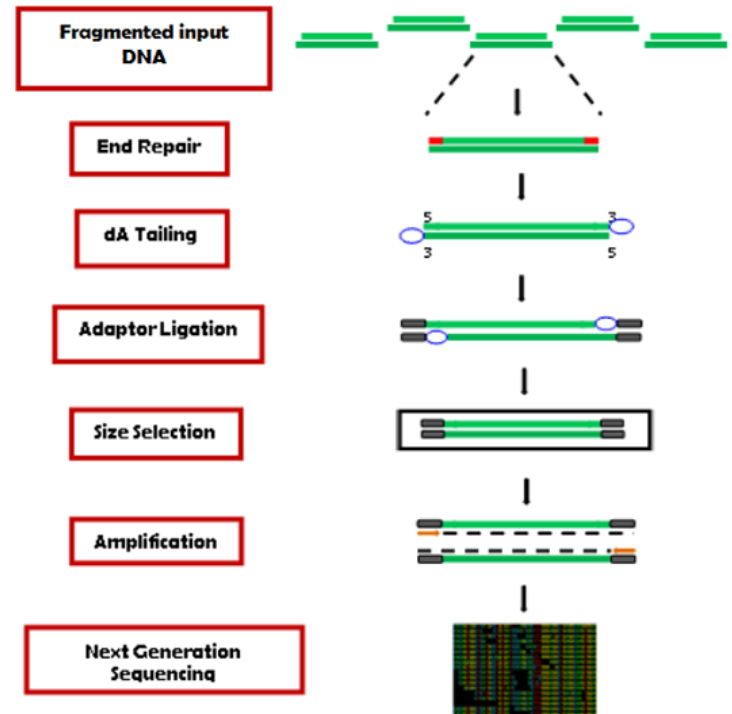


④ Laser detection of flouochromes and computational sequence analysis



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 (evoluční biol.)
 - sekvenování chromozomů, plazmidů, mt
 - studium genetické variability, mutační analýza
 - transkriptomová analýza
 - antropologie: srovnávání DNA k zjišťování migrací lidských ras (zejména podle mitochondriální DNA a Y-chromozomální DNA)

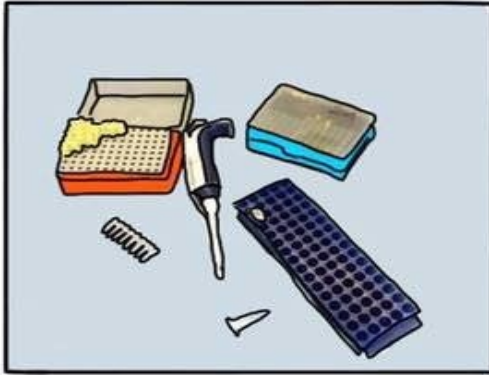


Video pro názornost:

<https://www.youtube.com/watch?v=shoje9IYWc>

PCR Protocol

Get the reagents



Prepare the mix



Set up conditions



Analyze the gel



Negative result



Cry

