

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

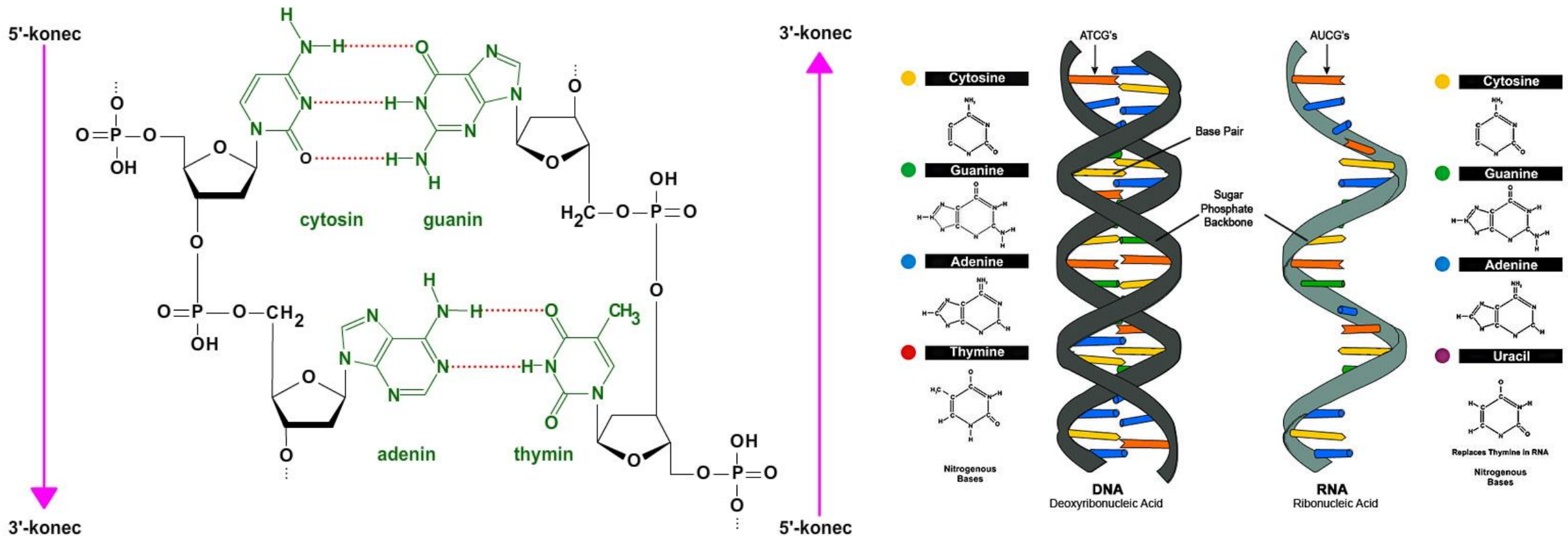
Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

- 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:

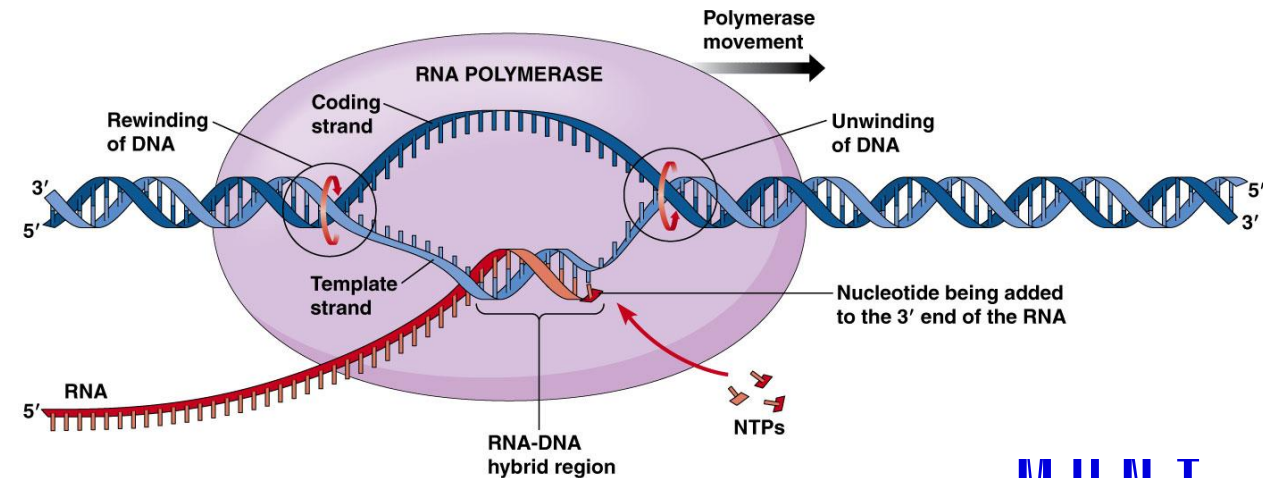
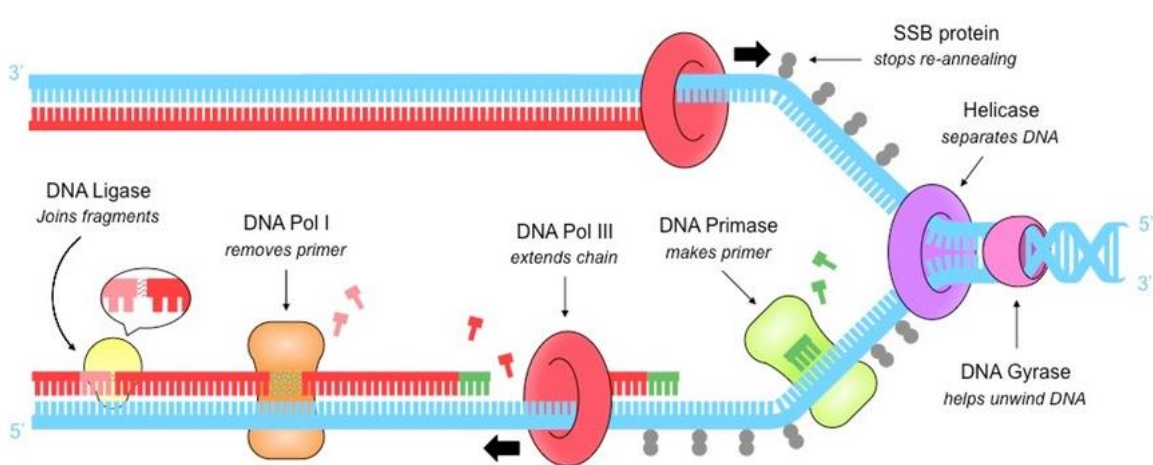
- sekundární stavba DNA a RNA, dvojitá vláknice, párování bází



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

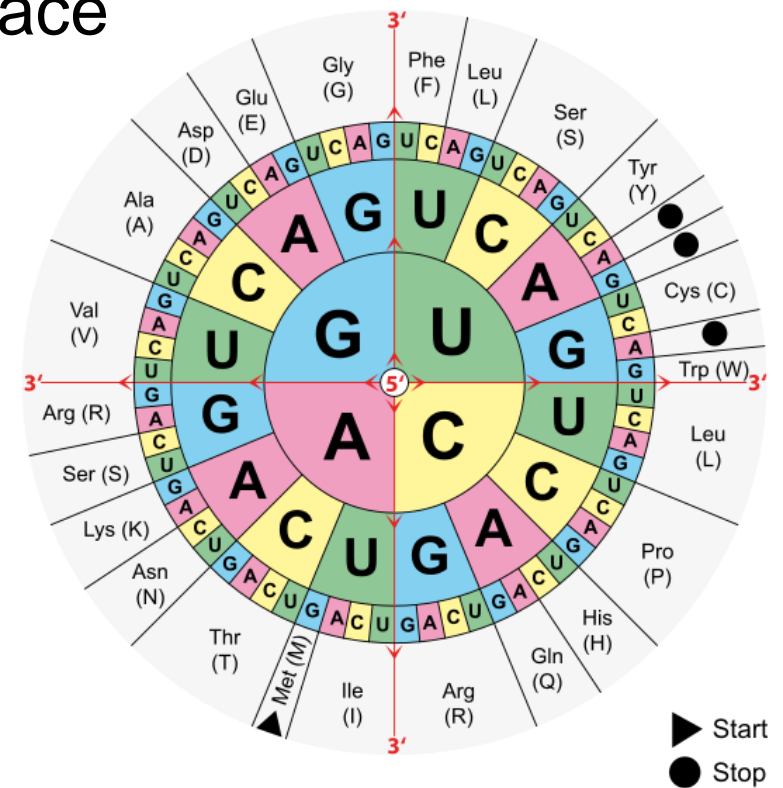
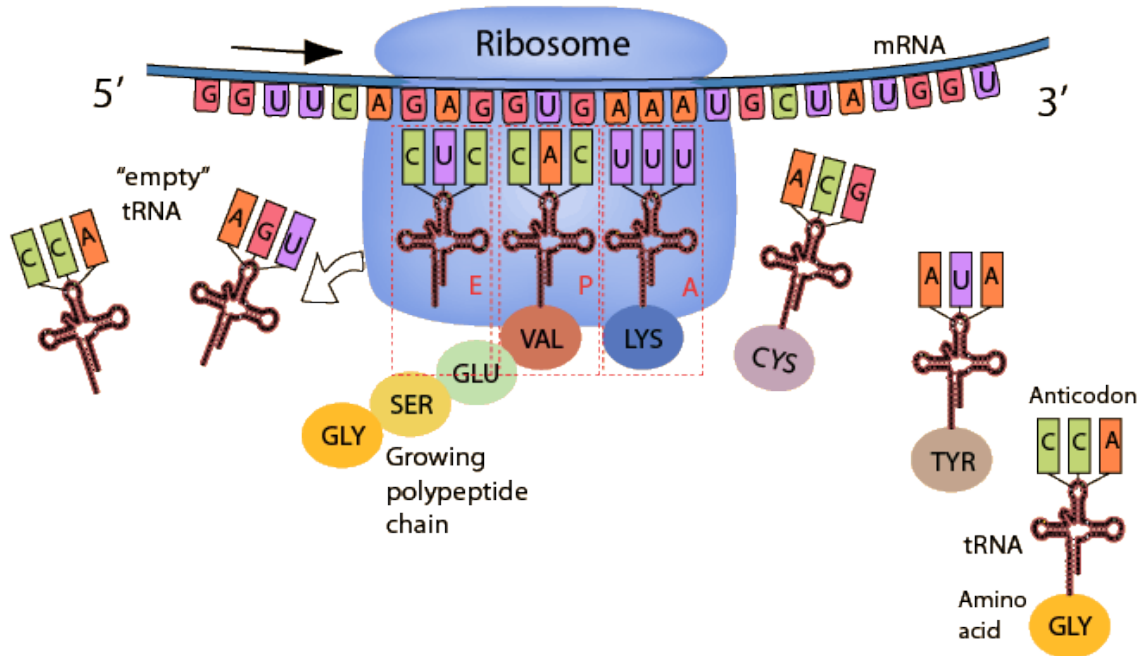


© 2012 Pearson Education, Inc.

1. Opakování pojmů z molekulární biologie

Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

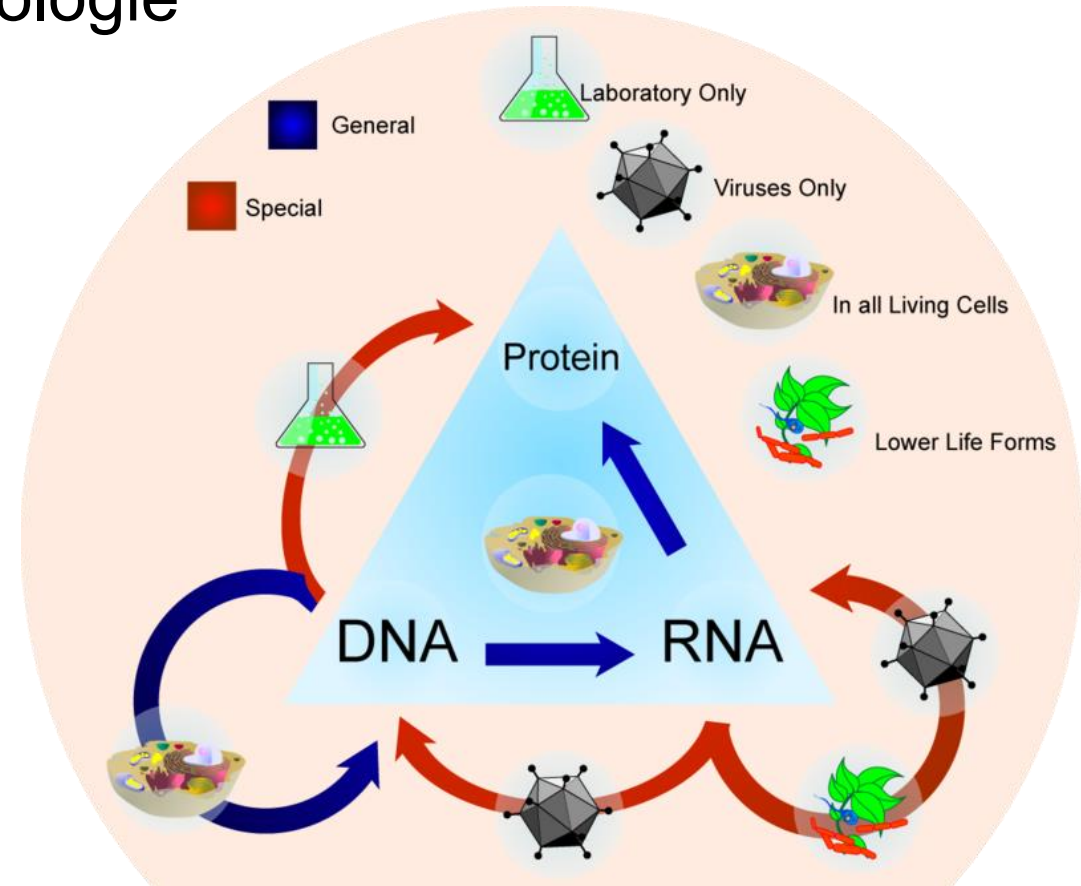
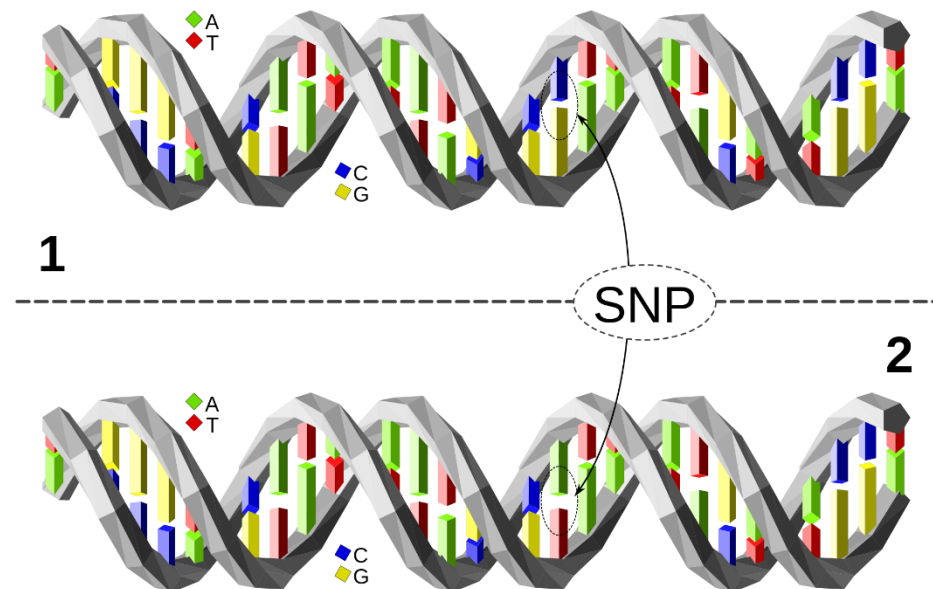
- translace – kde, ribozomy, endoplazmatické retikulum, genetický kód, kodony vs antikodony, posttranslační modifikace



1. Opakování pojmů z molekulární biologie

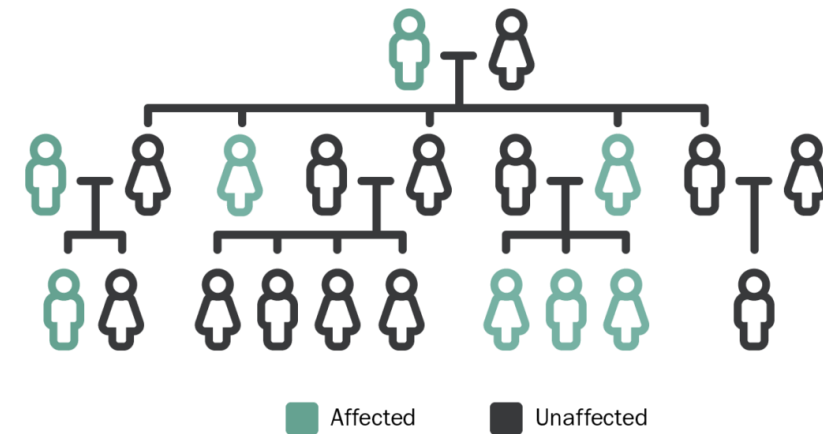
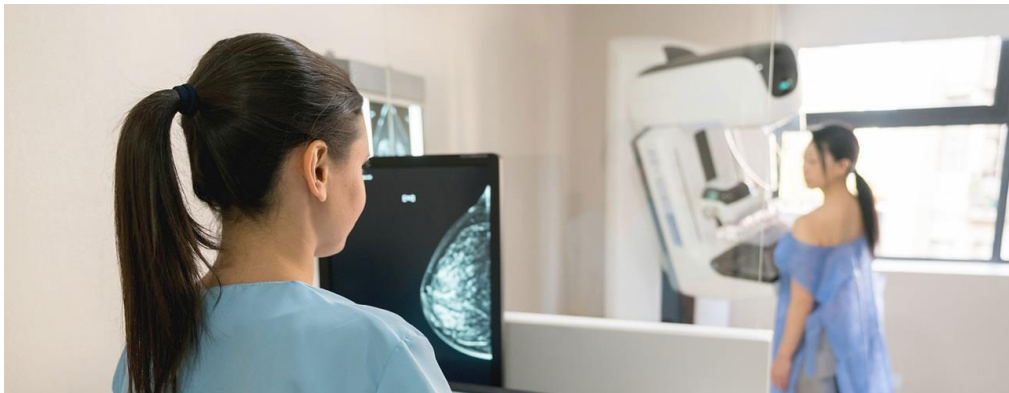
Co byste již měli znát a jenom si zopakovat:

- centrální dogma molekulární biologie
- mutace vs polymorfismus



2. Genetická diagnostika

- upřesnění diagnózy
- výběr správné léčby
- predikce rizika do budoucnosti
- ✓ specializovaná péče
- zaměření na konkrétní mutaci



2. Genetická diagnostika



- cílí na konkrétní mutace v genu nebo chromozomu
- a) postnatální diagnostika
 - upřesnění diagnózy, výběr správné léčby, predikce rizika
 - častější návštěvy lékaře, cílené vyšetření, změna životního stylu...
- b) prenatální diagnostika
 - stanovení rizika nemoci u plodu/embrya
 - výhoda připravenosti
- c) preimplantační diagnostika



2. Genetická diagnostika

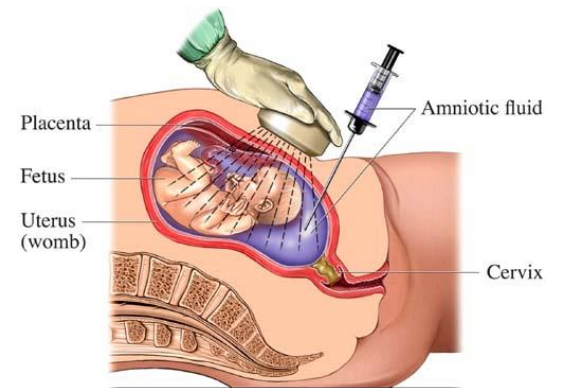
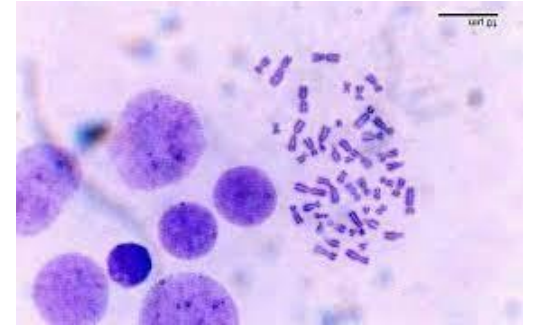
- výsledky genetického vyšetření mohou být k dispozici za několik hodin, nebo třeba i měsíců
- vliv na to má:
 - a) složitost použité metodiky
 - b) nutnost kultivace buněk (může trvat i týden)
 - c) pracoviště v místě odběru / specializovaná laboratoř v rámci ČR
 - d) kvalita DNA
 - e) celý gen, nebo více genů vs. laboratoř přesně ví, jakou mutaci hledá



2. Genetická diagnostika

❖ Cytogenetické vyšetření

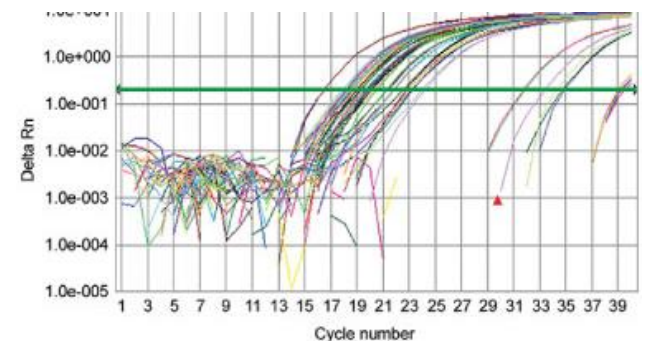
- vyšetřuje chromozomální aberace = odchylky na úrovni chromozomů
- stanovuje se karyotyp, počet a struktura chromozomů
- vzorky krve, kožní fibroblasty, nebo materiál získaný prenatalně invazivním způsobem → buňky se kultivují → BC zastaven v konkrétní fázi → ošetřeny barvivem/sondou → mikroskopicky vyhodnocovány



2. Genetická diagnostika

❖ Molekulární genetika

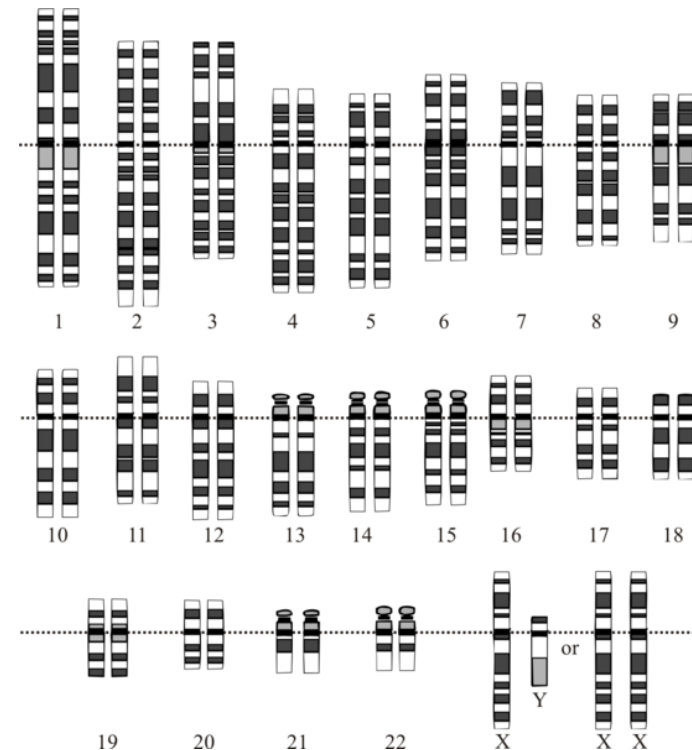
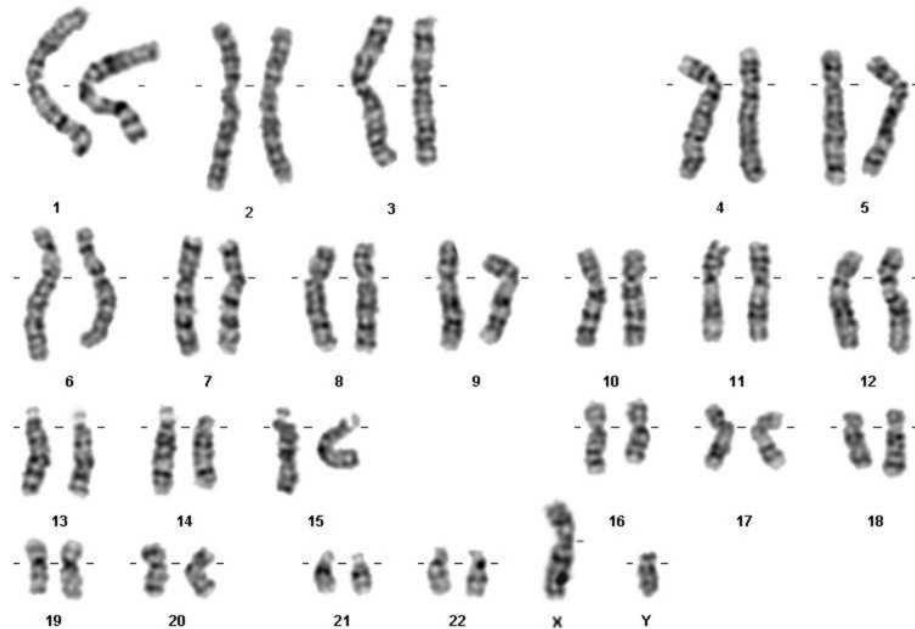
- identifikuje patologické změny DNA na molekulární úrovni
- vyšetřována nemoc způsobená mutací v genu
- izolace lidské genomové DNA z krve, tkání, nebo buněk po kultivaci → pomnožení konkrétního úseku (PCR) → hodnocení různými molekulárními technikami.



* některé cytogenetické metody

G-pruhování = Giemsovo barvení

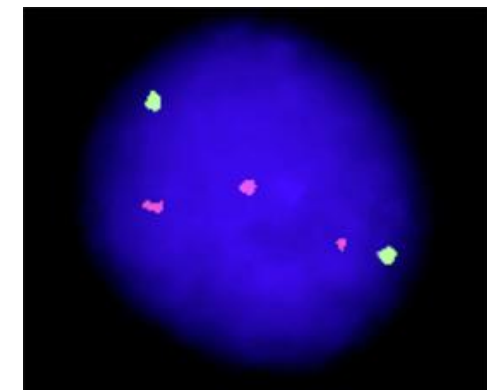
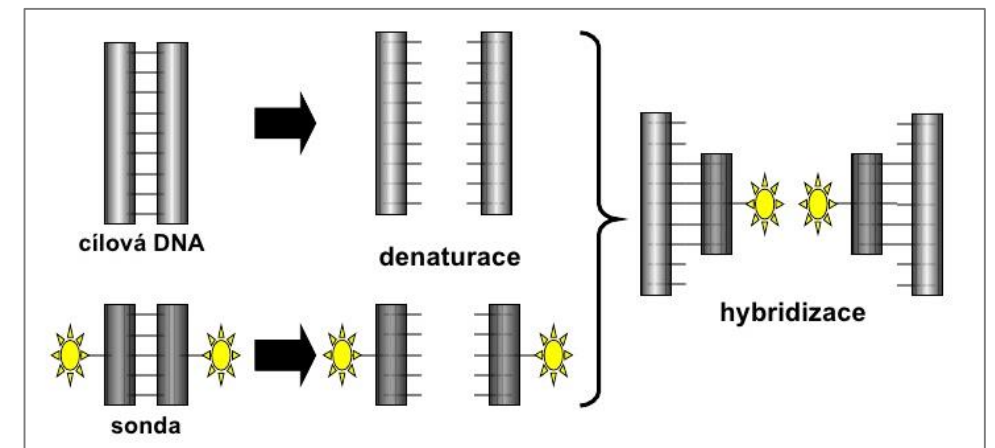
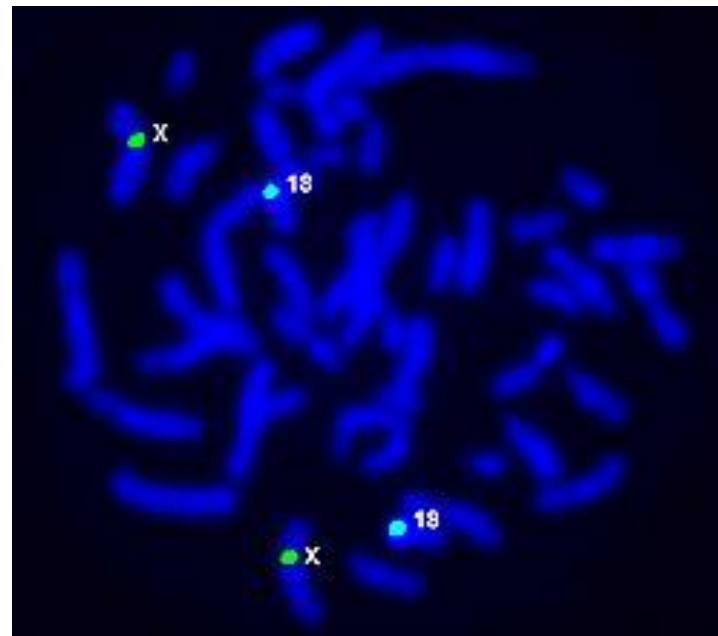
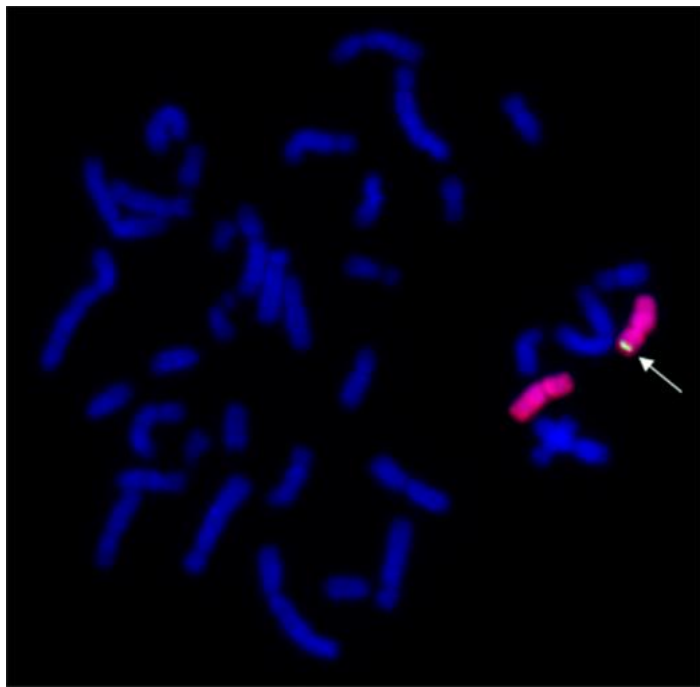
- nejčastěji rutinně užívaná metoda
- chromosomy vystaveny účinkům trypsinu a obarveny Giemsovým barvivem
- každý chromosom se specificky obarví



* některé cytogenetické metody

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

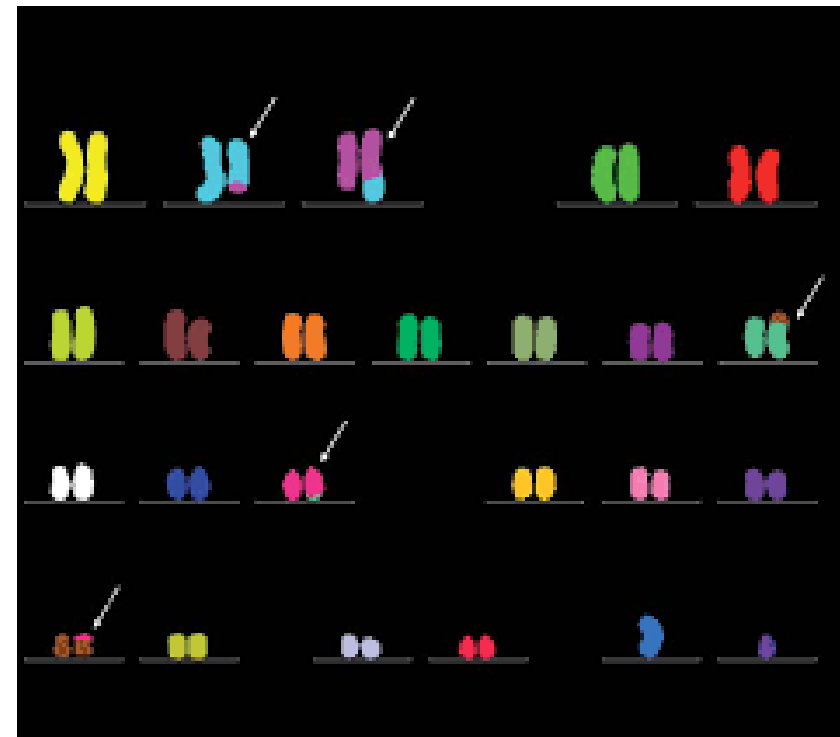
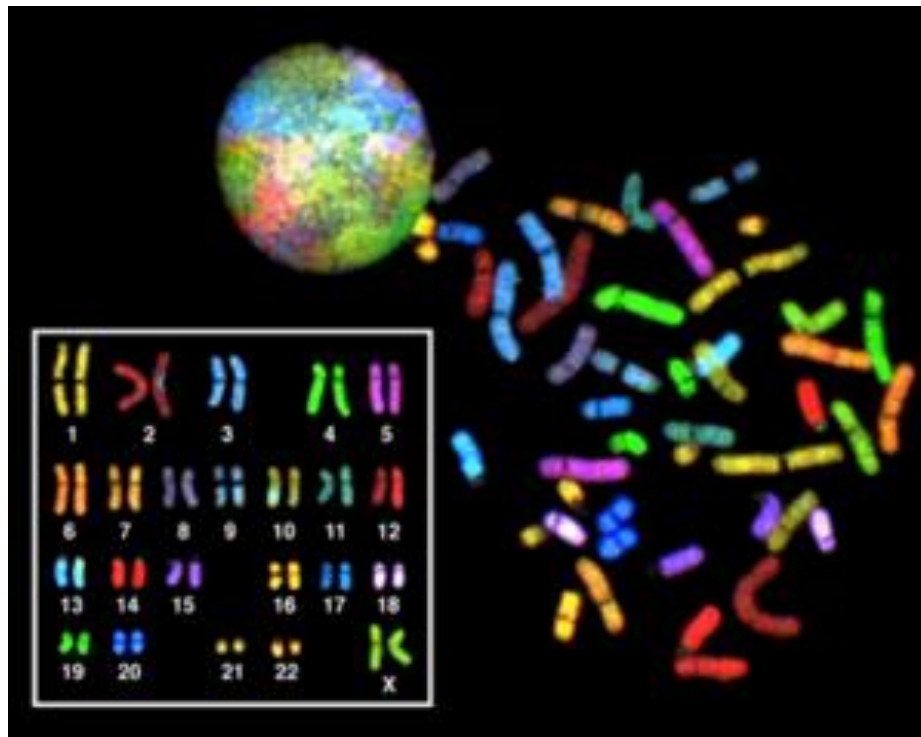
- fluorescenční obarvení části chromozomu pomocí komplementární sondy



* některé cytogenetické metody

Spektrální karyotypování (SKY)

- identifikace každého chromosomu pomocí jedinečné kombinace 5 fluorochromů



3. Metody molekulární biologie

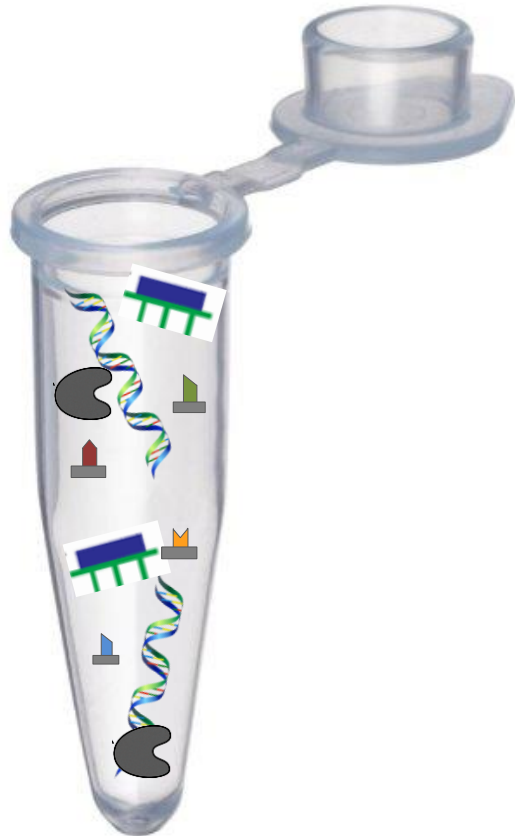
- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)

mutace v genu XY
záměna G za A



3. Metody molekulární biologie

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



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

3. Metody molekulární biologie

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

mutace v genu XY
záměna G za A

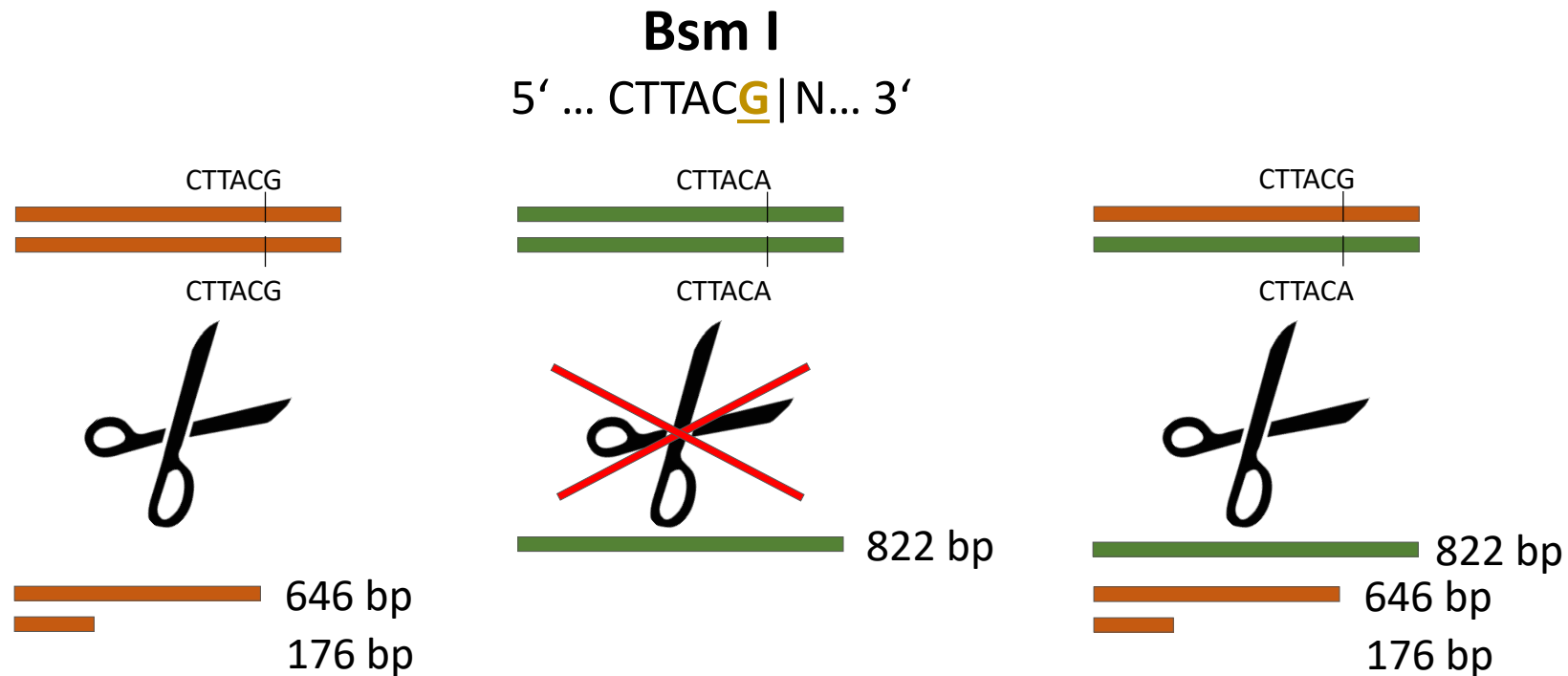


PCR produkt = 822 bp



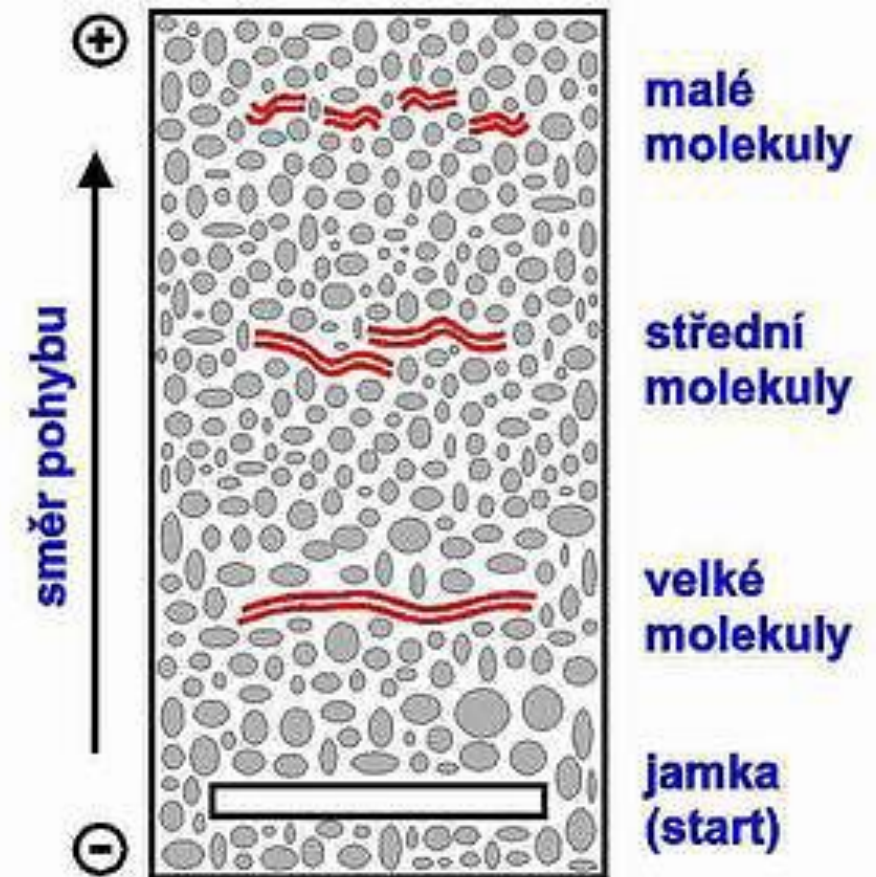
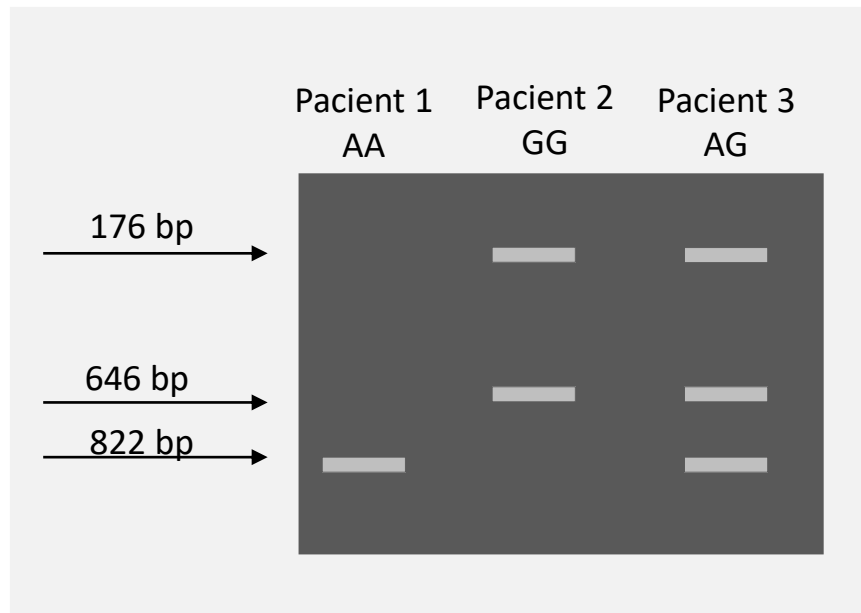
3. Metody molekulární biologie

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



3. Metody molekulární biologie

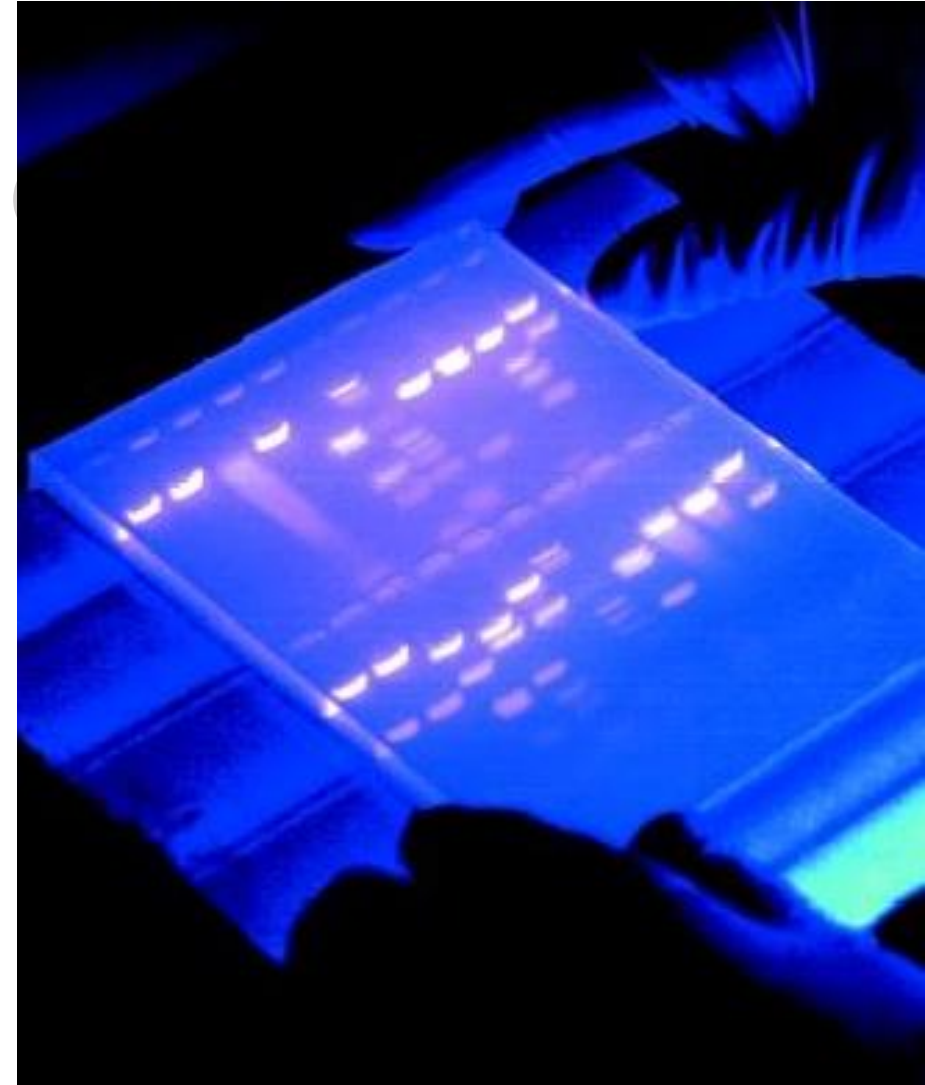
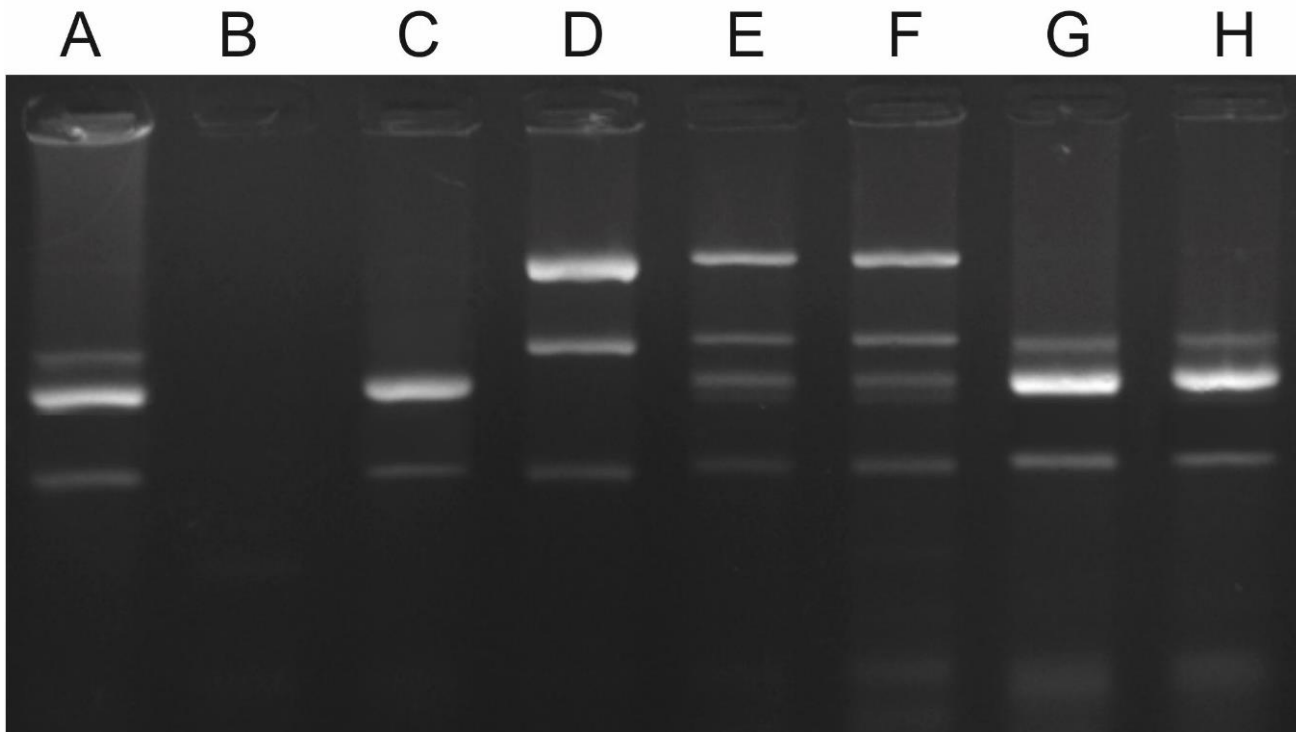
- polymerázová řetězová reakce (PCR)
- polymorfismus délky restričních fragmentů (
- **gelová elektroforéza**
(agarózový gel / polyakrylamidový gél)



Obr. 3. Pohyb molekul různé velikosti v gelu.

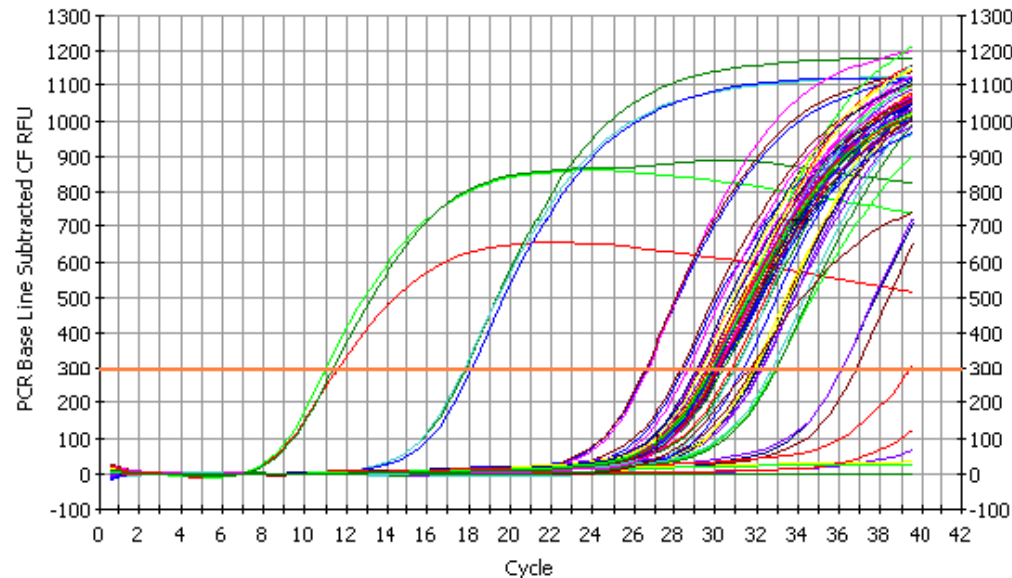
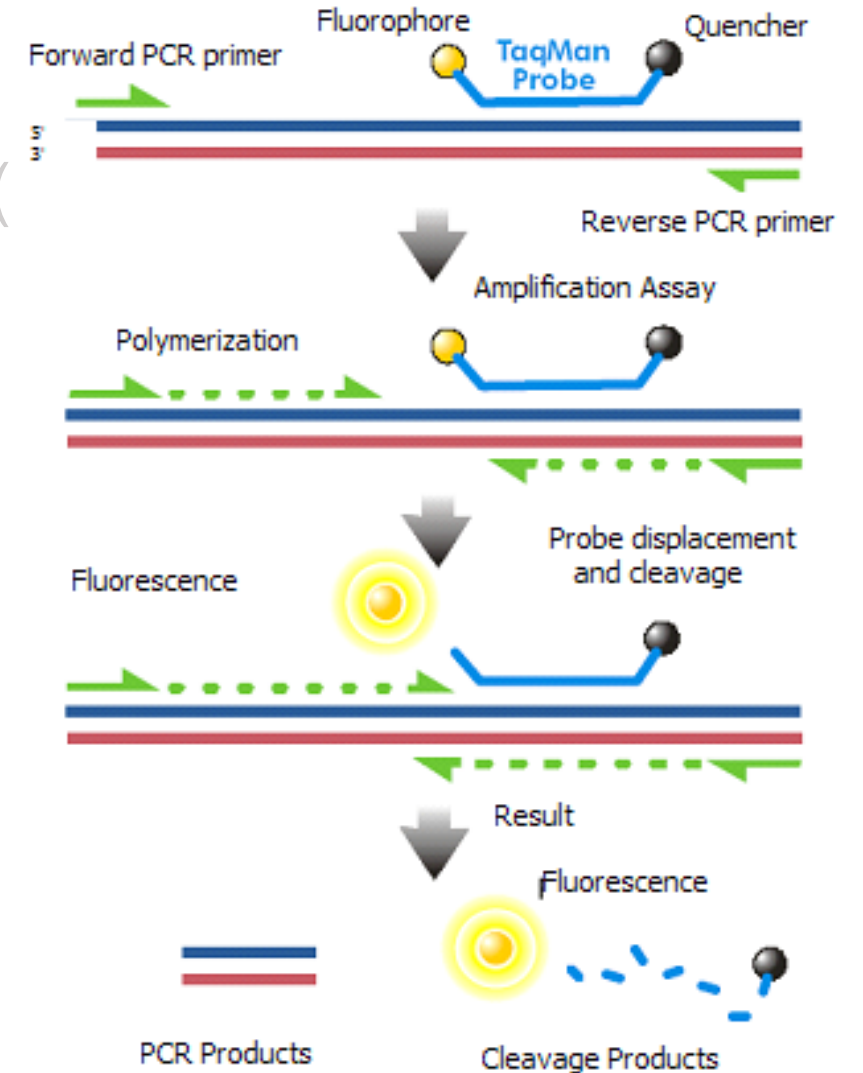
3. Metody molekulární biologie

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



3. Metody molekulární biologie

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

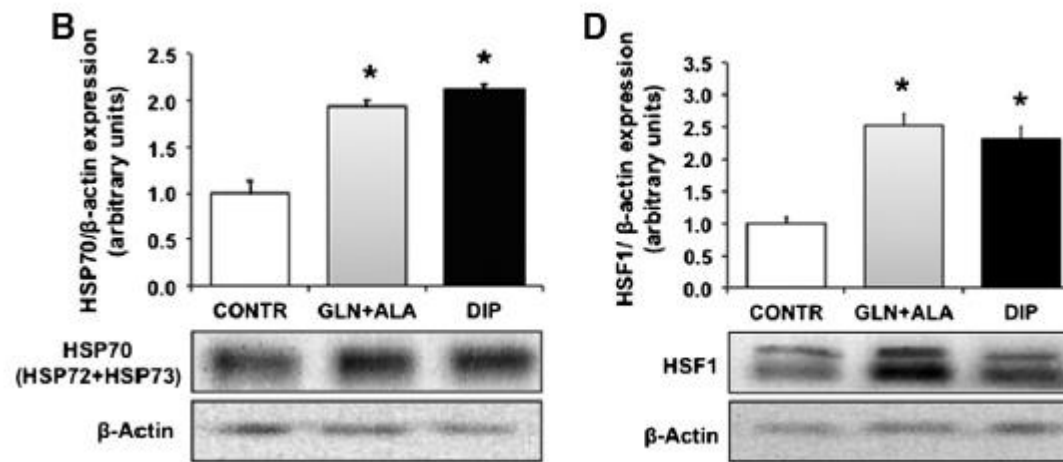


3. Další metody molekulární biologie

- analýza proteinové exprese imunohistochemicky
- analýza genové exprese T-PCR

„suplementace alaninem a glutaminem chrání buňku před oxidačním stresem během cvičení“

- Intenzivní cvičení – tvorba ROS – potřeba antioxidačních mechanismů
 - HSP70 a HSF1 – součást **antioxidační** glukosaminové dráhy (GSH)
 - GSH syntetizován z **L-glutaminu** – intenzivní cvičení snižuje L-glutamin
- ? Ovlivní suplementace ALA+GLN proteinovou expresi HSP70 a HSF1 u potkanů?

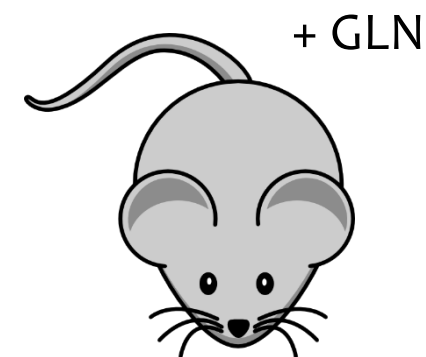


- struktura DNA neměnná
- exprese proteinů (a aktivita enzymů) se mění v závislosti od vnitřních a vnějších podmínek
- míru exprese (aktuální množství proteinu) můžeme sledovat pomocí vazby protilátka+antigen
 - čím víc proteinu ve vzorku – tím víc navázané protilátky – tím silnější signál

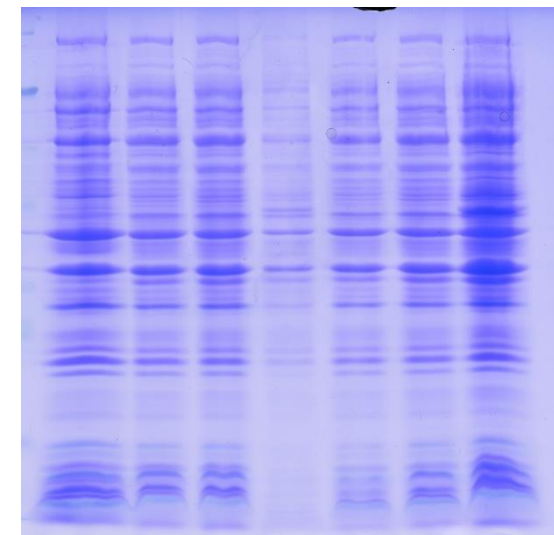
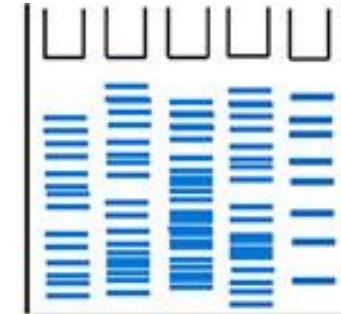
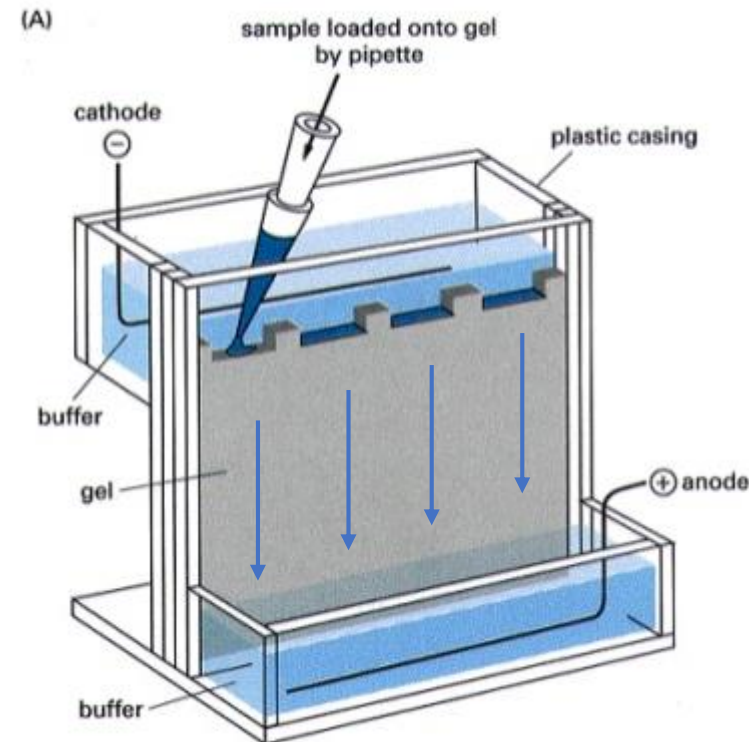
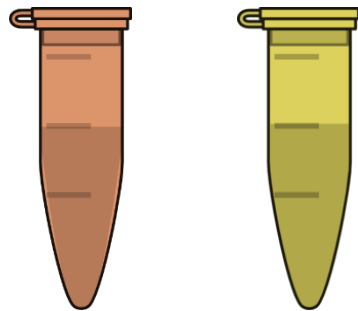
- 24 potkanů

- 8 týdnů

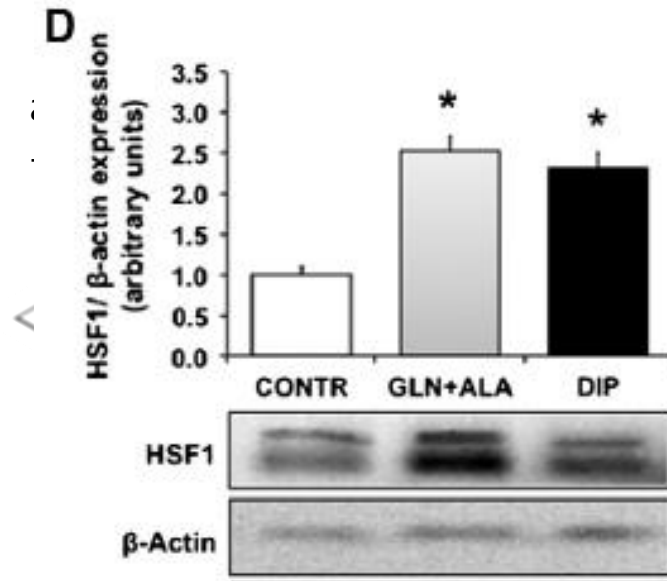
- cvičení 5 dnů / týden na 60 min



- izolace proteinů z biologického materiálu (sval *Soleus Muscle*)
- rozdělení fragmentů (proteinů) na akrylamidovém gelu

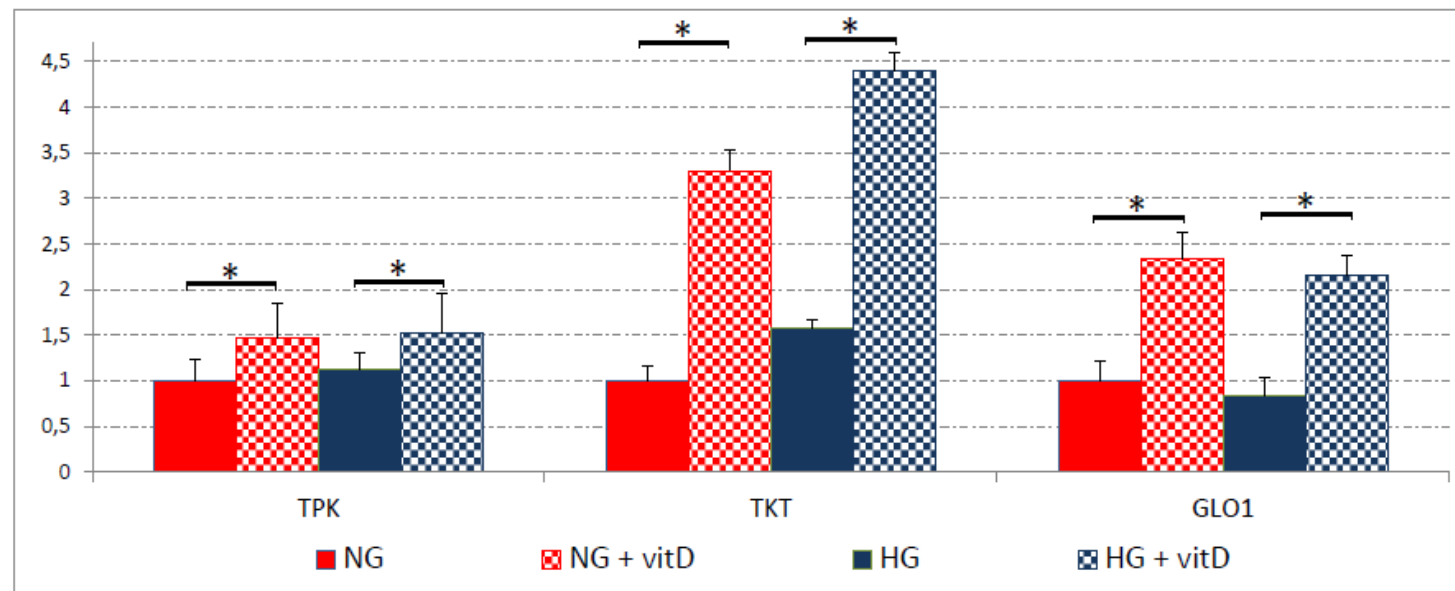


- izolace proteinů z biologického materiálu (sval *Soleus Muscle*)
- rozdělení fragmentů (proteinů) na akryl
- přebílení proteinů z gelu na membránu
- inkubace s protilátkami
- vizualizace signálu



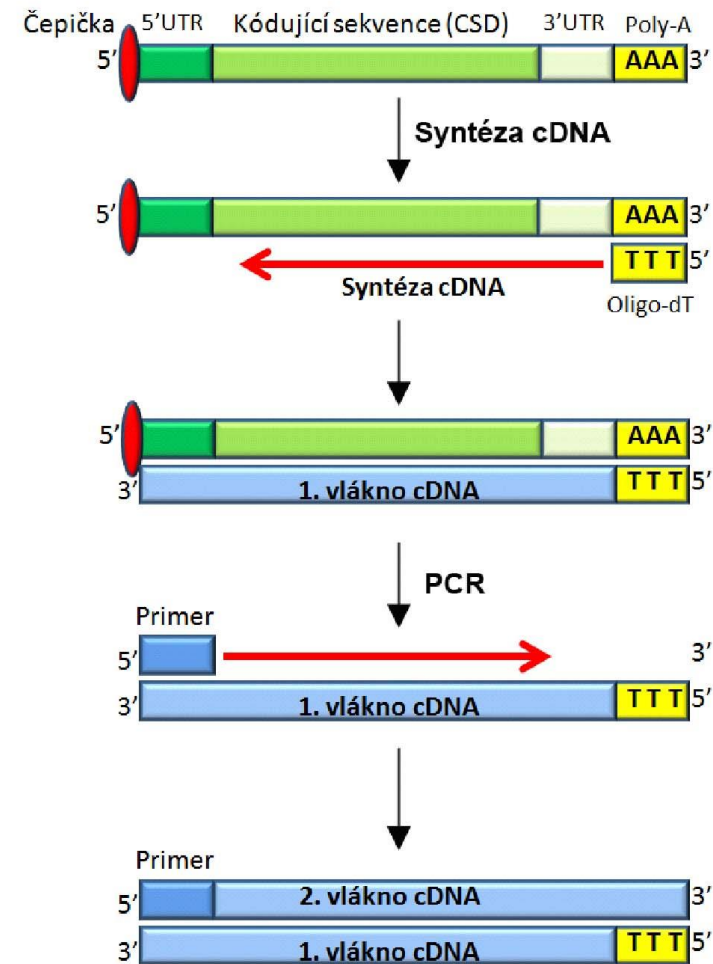
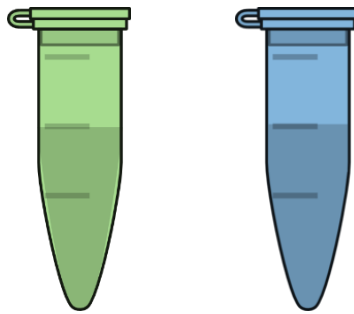
„vitamin D zvyšuje genovou expresi antioxidantních enzymů *in vitro* jak v normo- tak v hyperglykemických podmínkách“

- Diabetes – oxidační stres – potřeba antioxidantní ochrany buňky
- Vitamin D - ne jen Ca a P homeostázu – má i mnoho jiných efektů (DM)
- ? Má vit D vliv na genovou expresi enzymů, které by mohli buňky chránit před oxidačním stresem?

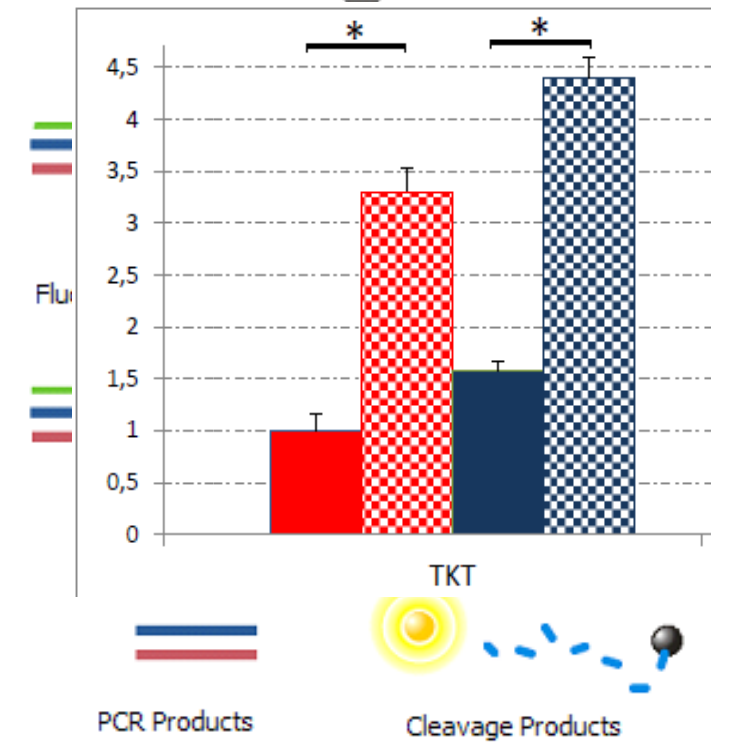
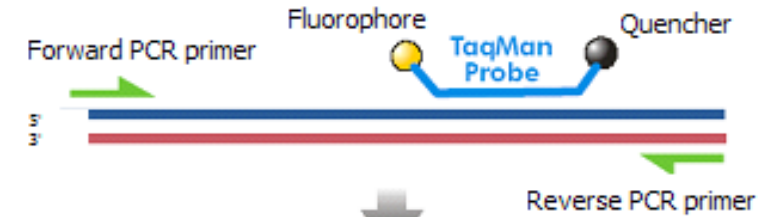
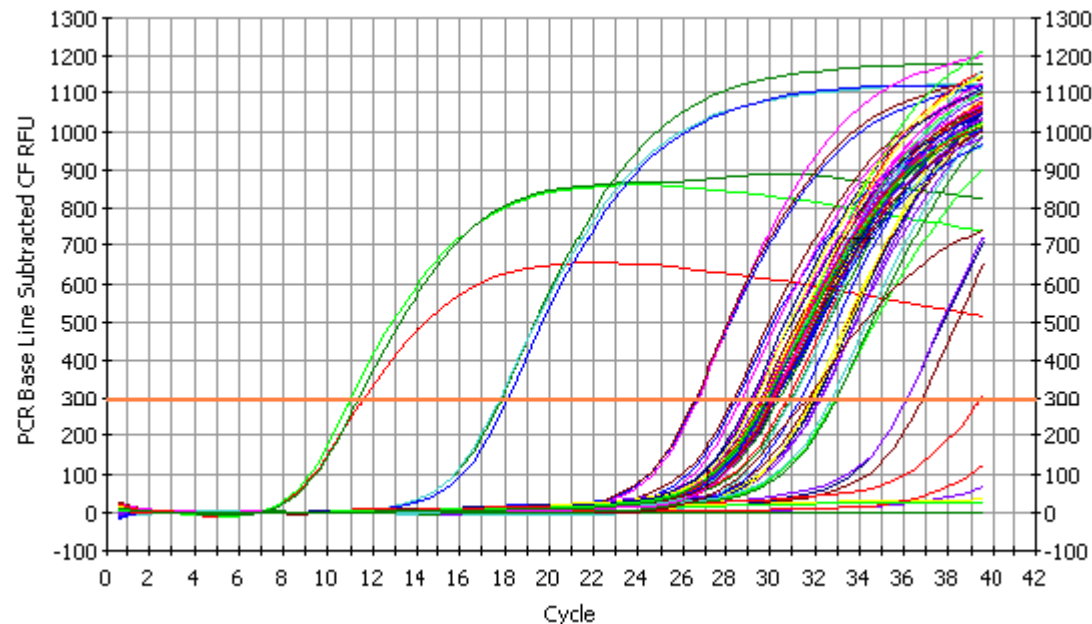


- struktura DNA neměnná
- exprese genů (a aktivita enzymů) se mění v závislosti od vnitřních a vnějších podmínek
- míru exprese (aktuální množství mRNA) můžeme sledovat pomocí metody real-time PCR
 - V reálním čase sledujeme exponenciální navyšování produktu a porovnání mezi sebou můžeme usoudit původní relativní množství

- Izolace total RNA – měření koncentrace
- Přepis – reverzní transkripce enzymem Rev transkriptáza



- Izolace total RNA – měření koncentrace
- Přepis – reverzní transkripce enzymem Rev transkriptáza
- RT-PCR – syntéza cDNA a sledování v reálném čase
- Vyhodnocení relativního množství metodou $\Delta\Delta Ct$

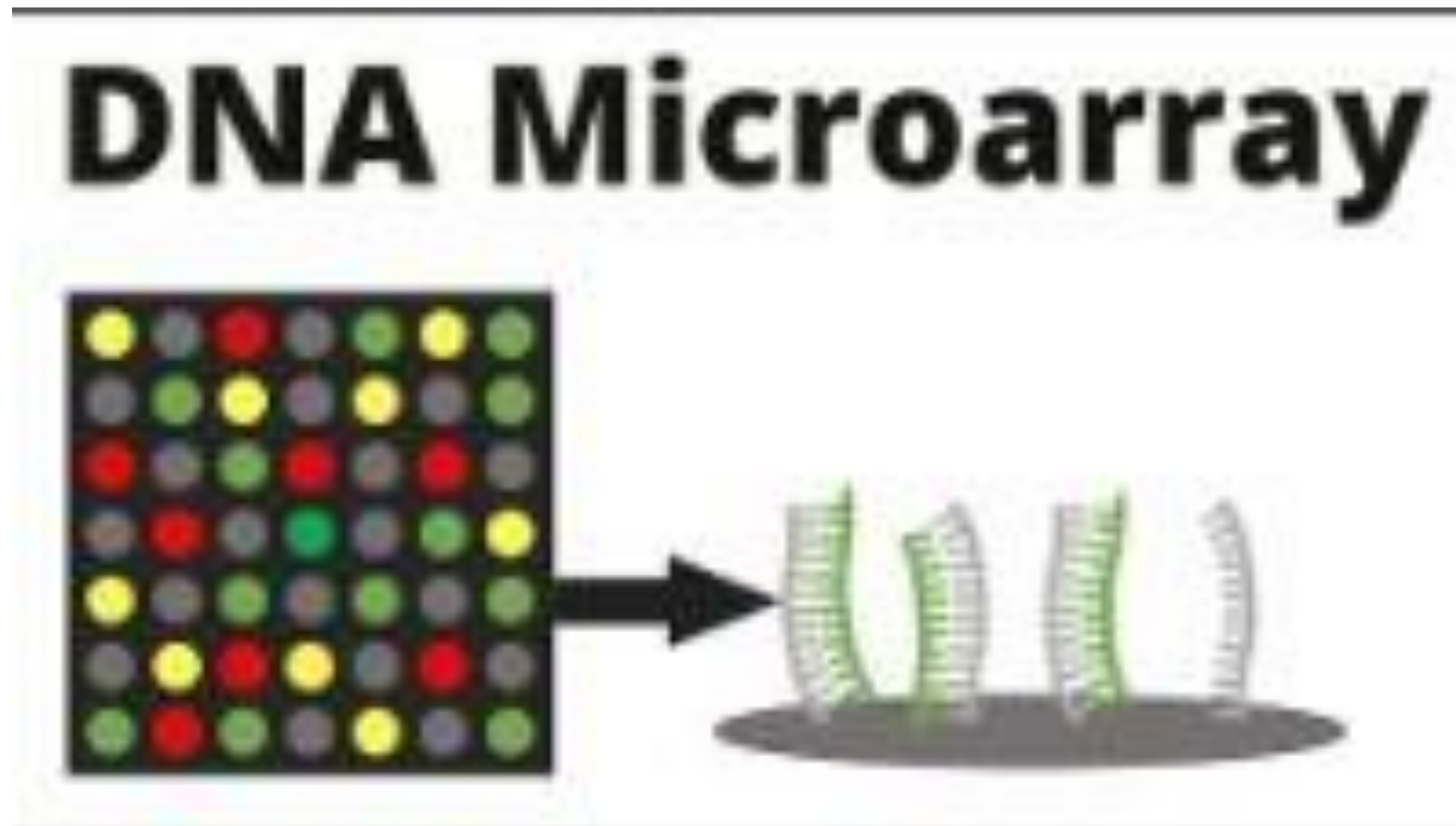


3. „Nové“ metody molekulární biologie

- čipové metody, microarrays
- sekvenování DNA

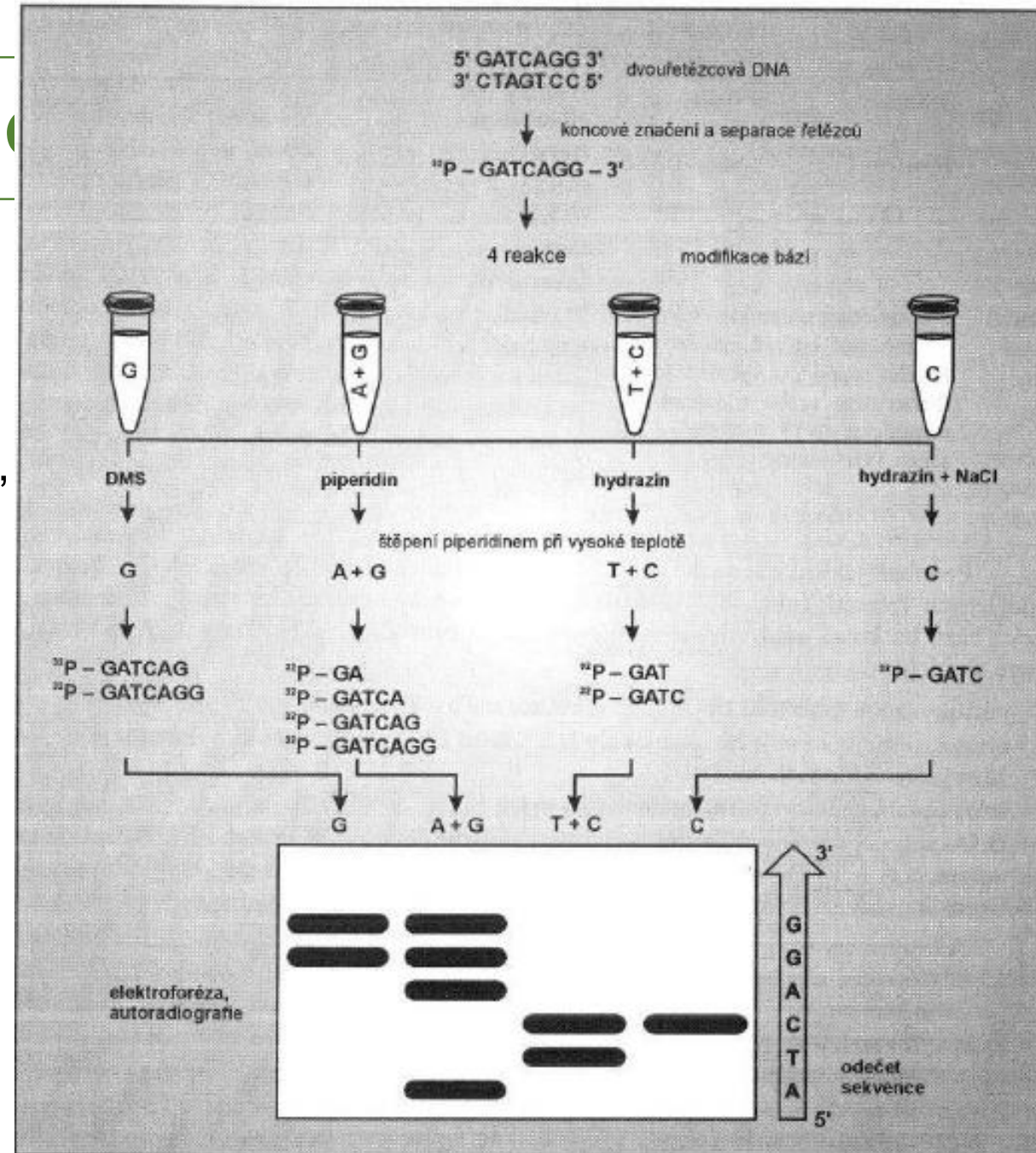
3. „Nové“ metody molekulární biologie

- čipové metody, microarrays



3. „Nové“ metody m

- sekvenování DNA
- i. chemická metoda = **Gilbertovo s.**
 - podstatou je specifické štěpení DNA v místech, kde je lokalizovaná báze určitého typu



3. „Nové“ metody mol

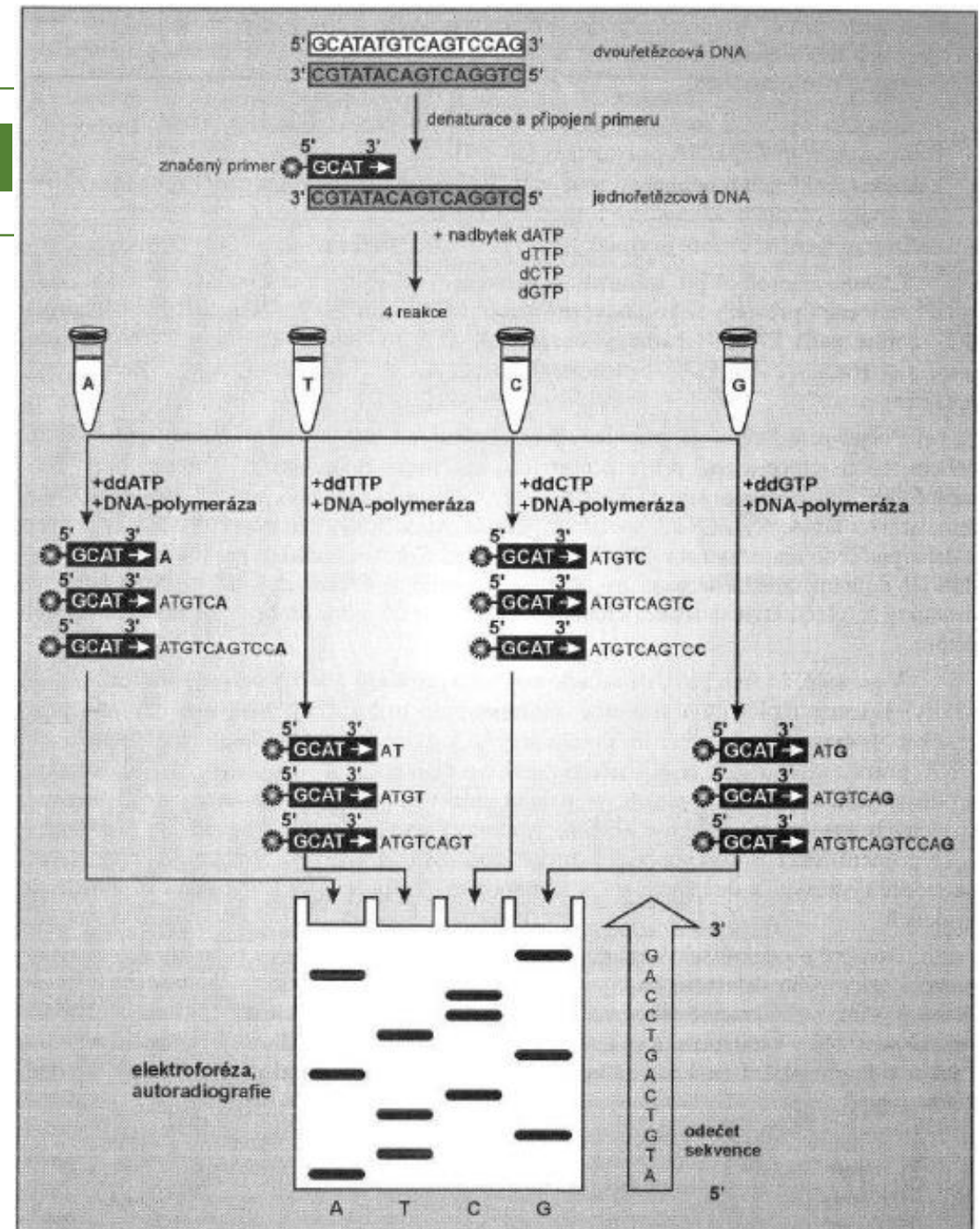
- sekvenování DNA

- i. chemická metoda = **Gilbertovo s.**

- podstatou je specifické štěpení DNA v místech, kde je lokalizovaná báze určitého typu

- ii. enzymová metoda = **Sangerovo s.**

- „čtená“ DNA použita jako matrice pro PCR
 - PCR začíná od značeného primeru
 - PCR končí u terminatoru = ddNTP = dideoxy-ribonukeotid-fosfát = konec, chybí -OH skupina
 - změs ddNTP a dNTP = různě dlouhé amplikony



3. „Nové“ metody mol

- sekvenování DNA

- i. chemická metoda = Gilbertovo s.**

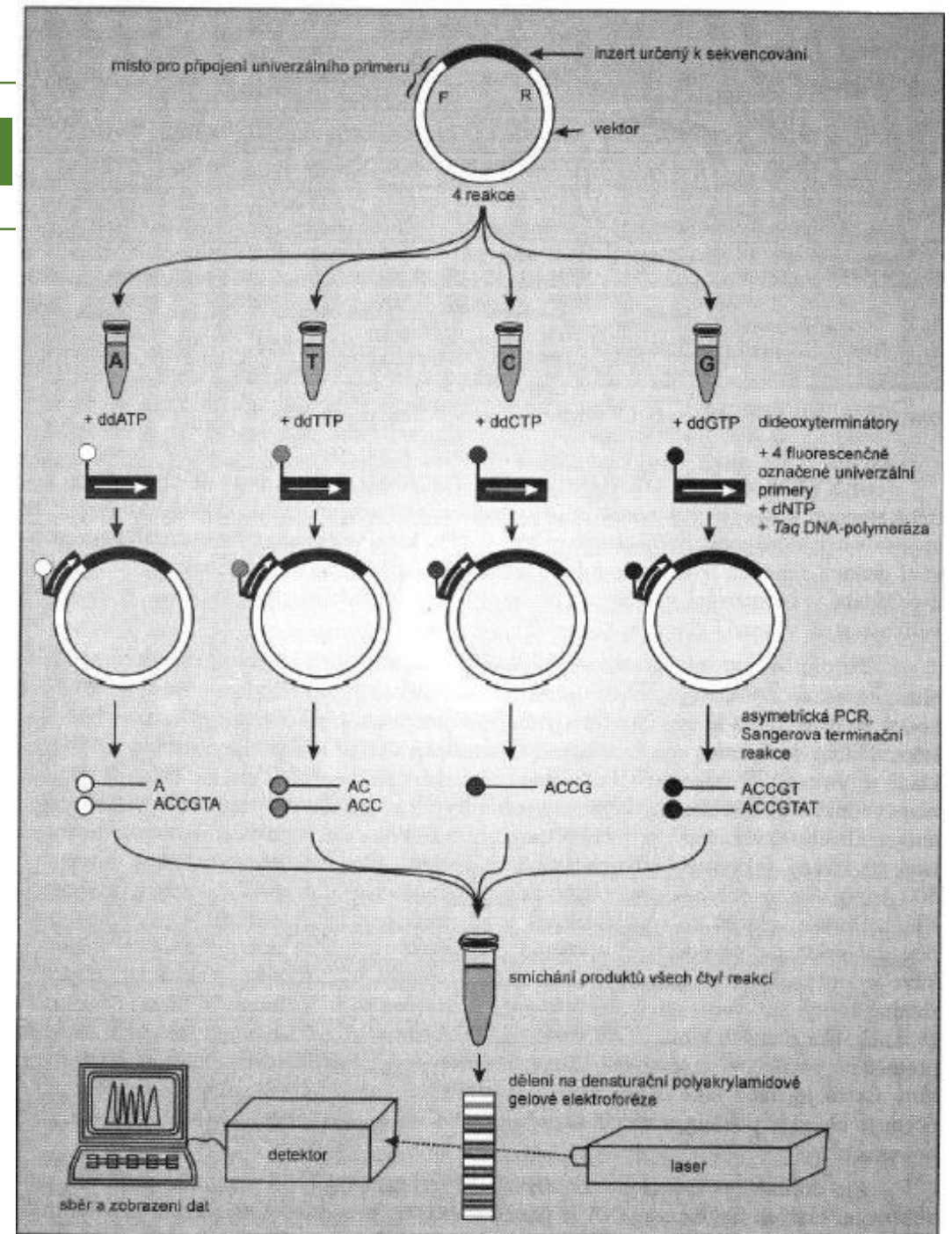
- podstatou je specifické štěpení DNA v místech, kde je lokalizovaná báze určitého typu

- ii. enzymová metoda = Sangerovo s.**

- „čtená“ DNA použita jako matrice pro PCR
 - PCR začíná od značeného primeru
 - PCR končí u terminatoru = ddNTP = dideoxyribonukleotid-fosfát = konec, chybí –OH skupina
 - změs ddNTP a dNTP = různě dlouhé amplikony

- iii. automatické sekvenování**

- nukleotidy specificky značené fluorescenčně



MUNI
MED