

C4182

Biochemie II

04-Metody studia nukleových kyselin

FRVŠ **1647/2012**

Obsah

- Metody studia nukleových kyselin
- Sekvenace
- PCR

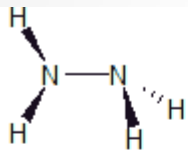
Určení sekvence DNA

- Sekvence DNA, základní principy
 - chemická (selektivní štěpení – Maxam-Gilbert)
 - biochemická (syntéza, dideoxy metoda - Sanger)
- Postupná sekvenace štěpů
- Kombinace oligonukleotidů
- Další zdokonalování metod, modifikace
- Vícekanálová zařízení
- Hybridizační sondy
 - FISH (fluorescence *in situ* hybridization)
- DNA čipy

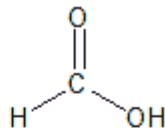
Určení primární struktury

- Chemická metoda Maxam-Gilbertova
- Specifické (téměř) štěpení řetězce činidly
- Pracná, málo efektivní, ale univerzální a nezávislá
 - Modifikace bazí – DMS – puriny
 - hydrazinolýza pyrimidinů
- Štěpení řetězce v místě této báze
 - G – DMS, piperidin
 - A+G – kys. mravenčí, piperidin
 - T+C – hydrazin, piperidin
 - T – hydrazin + NaCl, piperidin

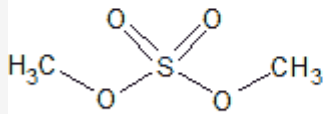
Destrukce bazí a štěpení řetězců



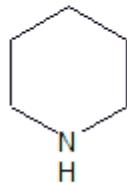
hydrazín



kys. mravčičia



dimetylsulfát



piperidín

Obr. Štruktúrne vzorce chem. modifikačných činidiel

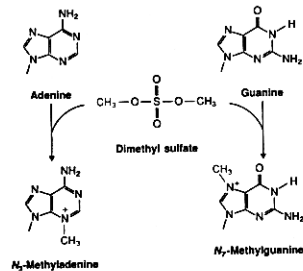


FIGURE 4A.1
Reaction of purines with dimethyl sulfate.

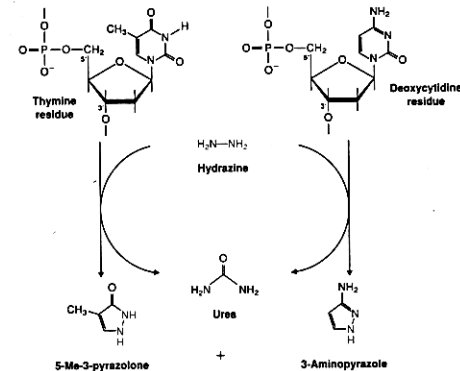
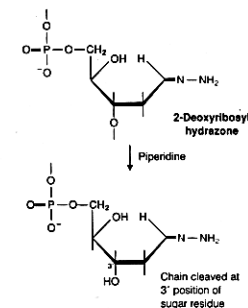


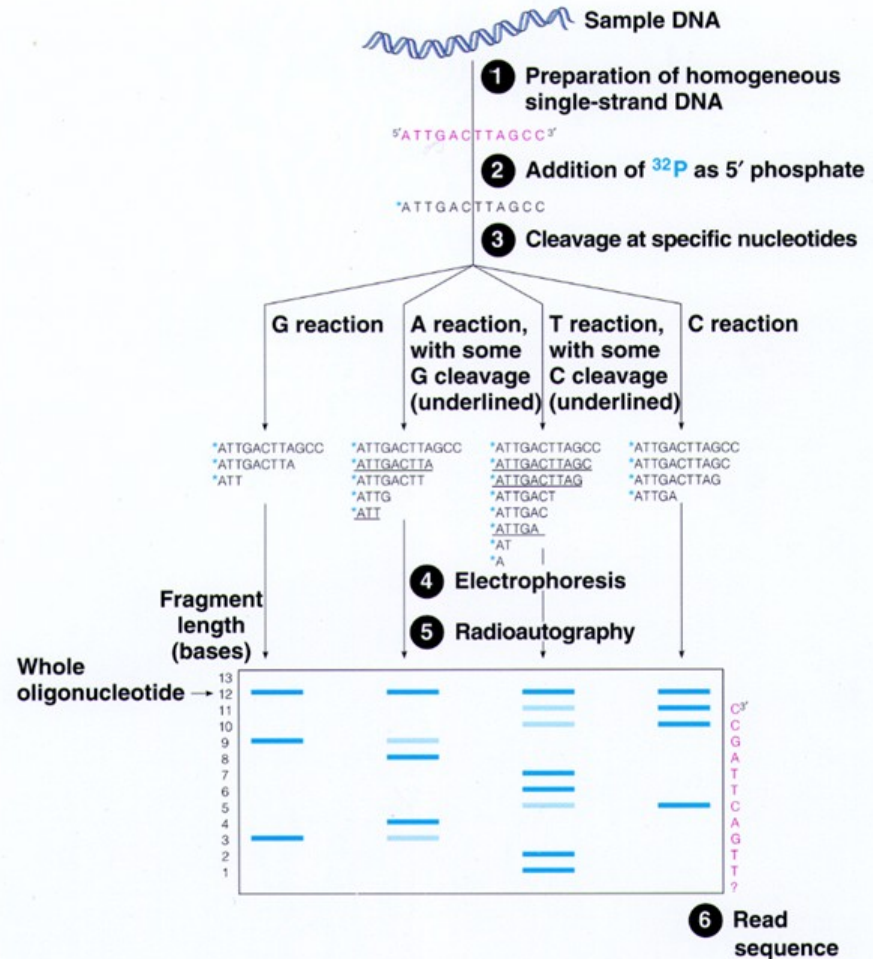
FIGURE 4A.2
Hydrazinolysis of pyrimidines.



Sekvenace DNA

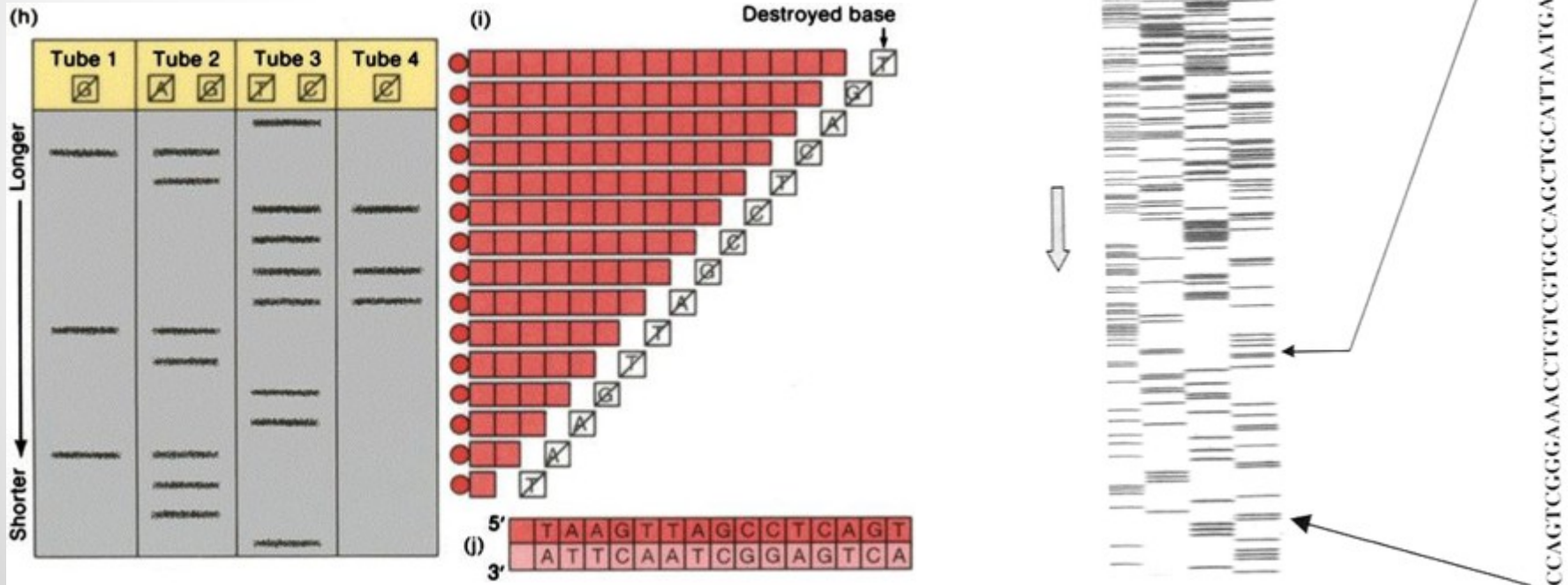
- Schema metody
- Ilustrace postupu
 - Od známe sekvence k výsledku

Figure 4A.4 Sequencing an oligonucleotide by the Maxam-Gilbert method



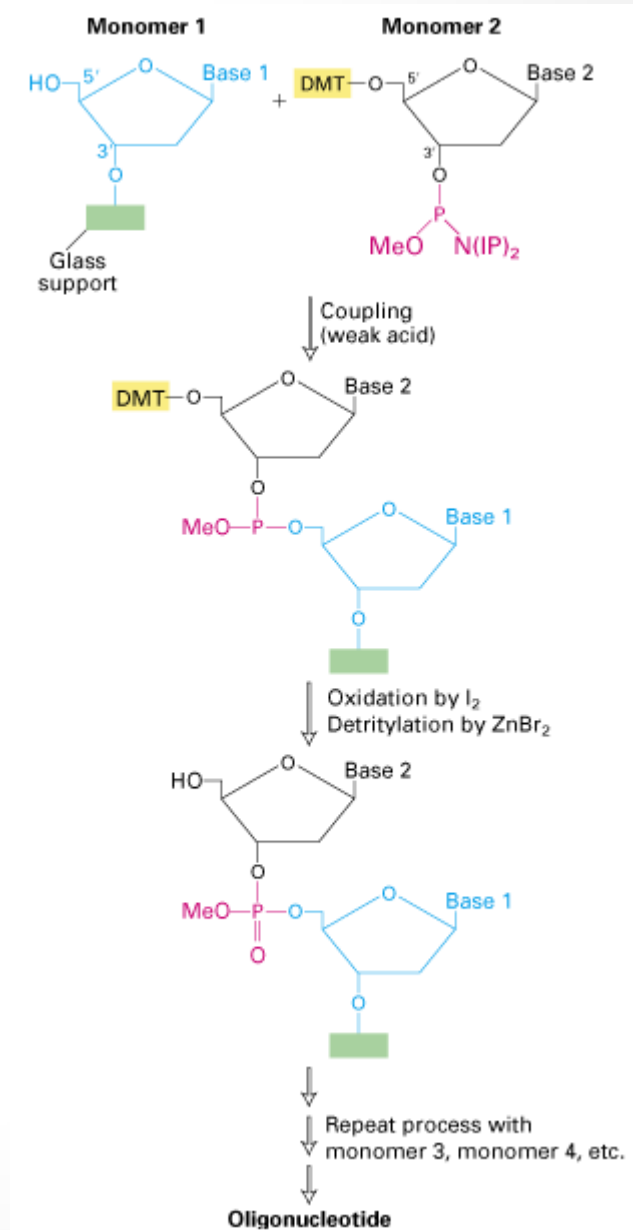
Sekvenace DNA

- Schema metody
- Ilustrace postupu
 - Od výsledku k sekvenci



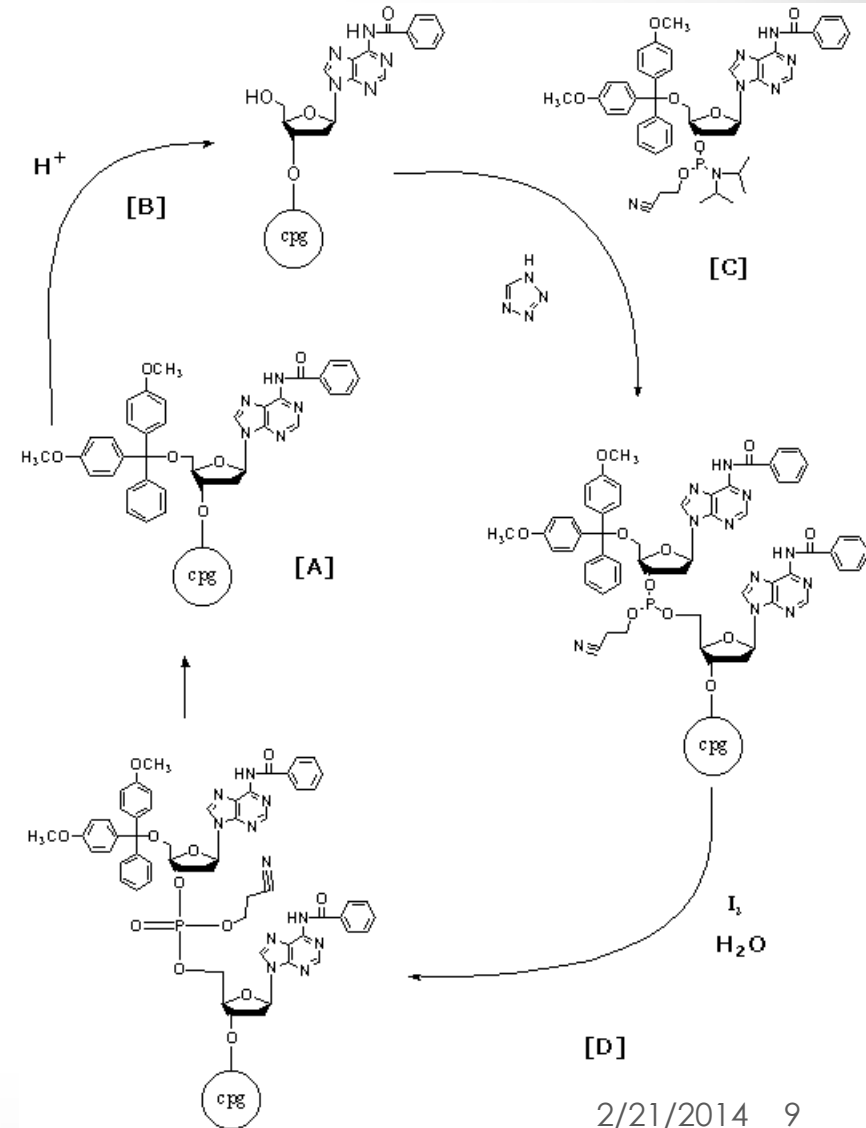
Syntéza oligonukleotidů

- Syntéza na pevné fázi
 - Monomery s aktivovanými a chráněnými skupinami
 - První zakotven na nosiči
 - Deblokace reagujících skupin
 - Vazba
 - Promývání
 - Cyklický proces - automatizace
- Příprava primerů
 - Komerční záležitost
- Umělé geny



Syntéza oligonukleotidů

- Fosforamiditová metoda
- Komerčně dostupné oligonukleotidy – primery
- Vlastní primery
- Umělé geny
- Modifikované geny



Syntéza oligonukleotidů

- Umělé geny
 - Delší geny po částech

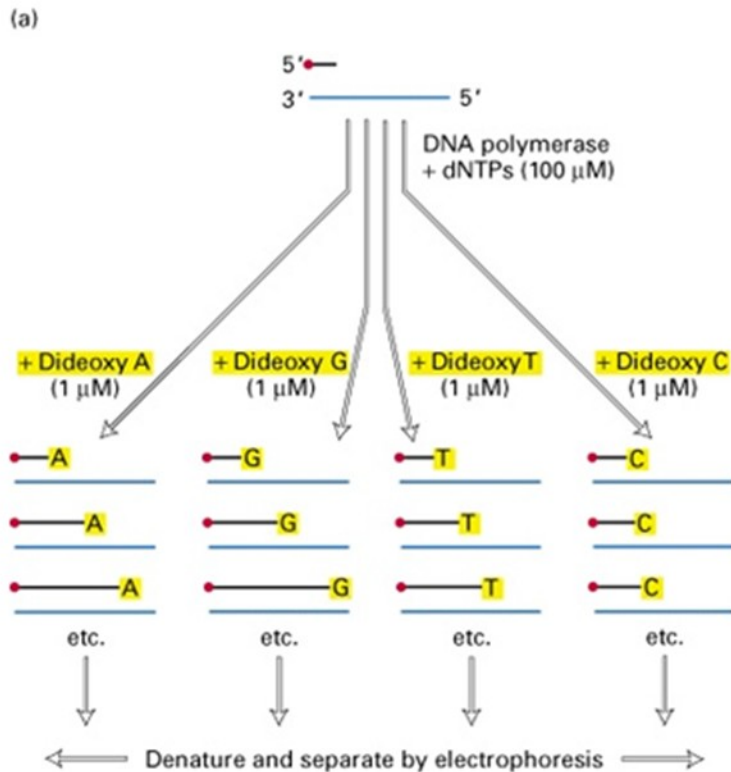
Table 12.3

Some Chemically Synthesized Genes

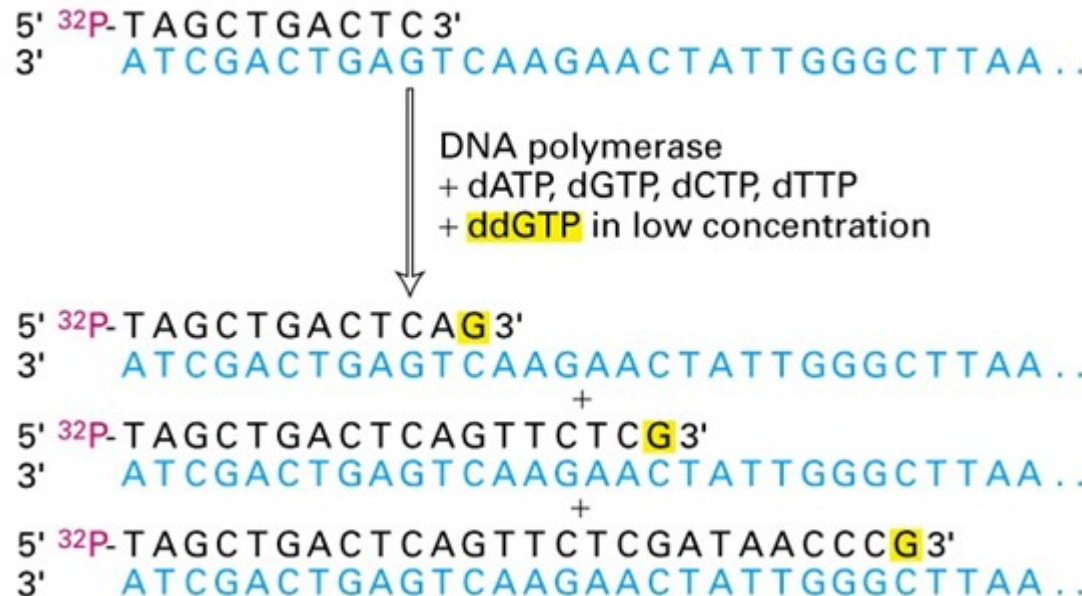
Gene	Size (bp)
tRNA	126
α -Interferon	542
Secretin	81
γ -Interferon	453
Rhodopsin	1057
Proenkephalin	77
Connective tissue activating peptide III	280
Lysozyme	385
Tissue plasminogen activator	1610
c-Ha-ras	576
RNase T1	324
Cytochrome <i>b</i> ₅	330
Bovine intestinal Ca- binding protein	298
Hirudin	226
RNase A	375

Určení sekvence DNA

- Dideoxy sekvenace – nápodoba replikace
 - Značené primery (+ dNTP, DNA polymerasa, templát - ssDNA)
 - Dideoxy (dd)NTP – 4 nádoby (a)
 - Produkty končí danou bází = (b)

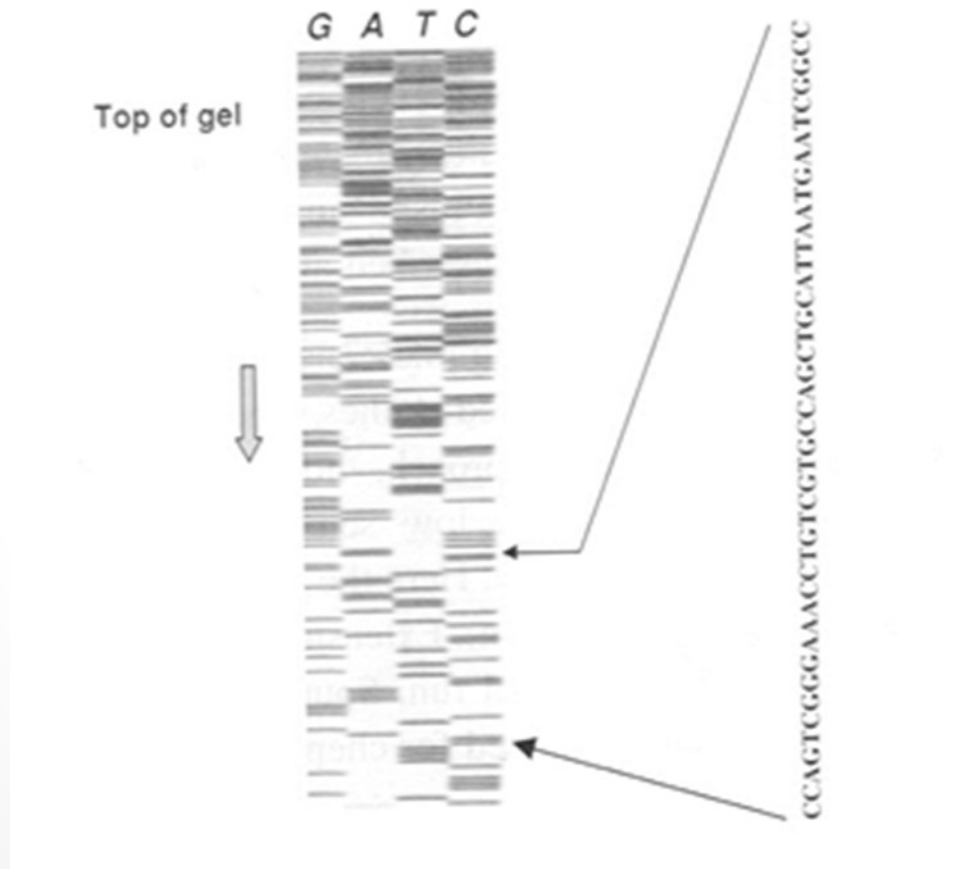


(b)



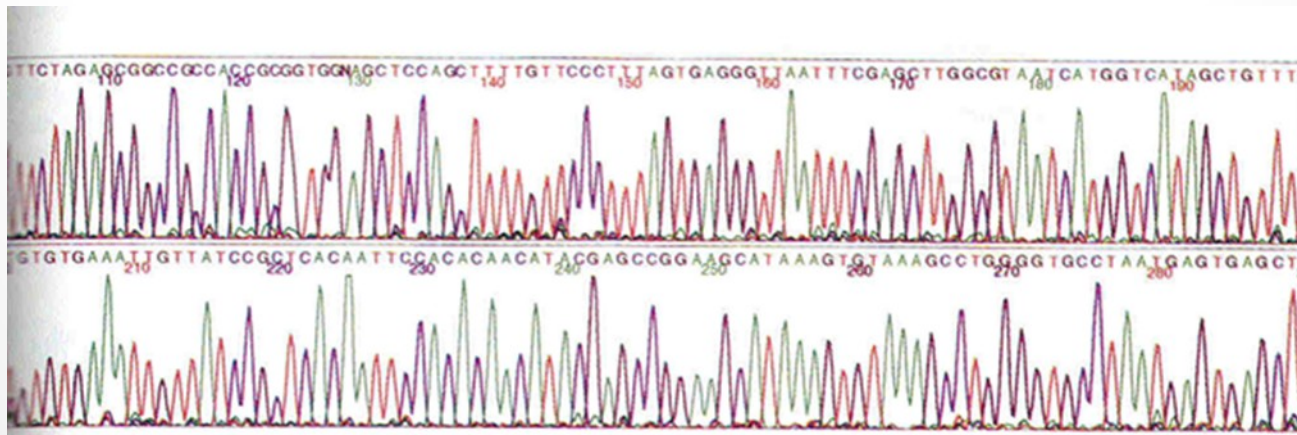
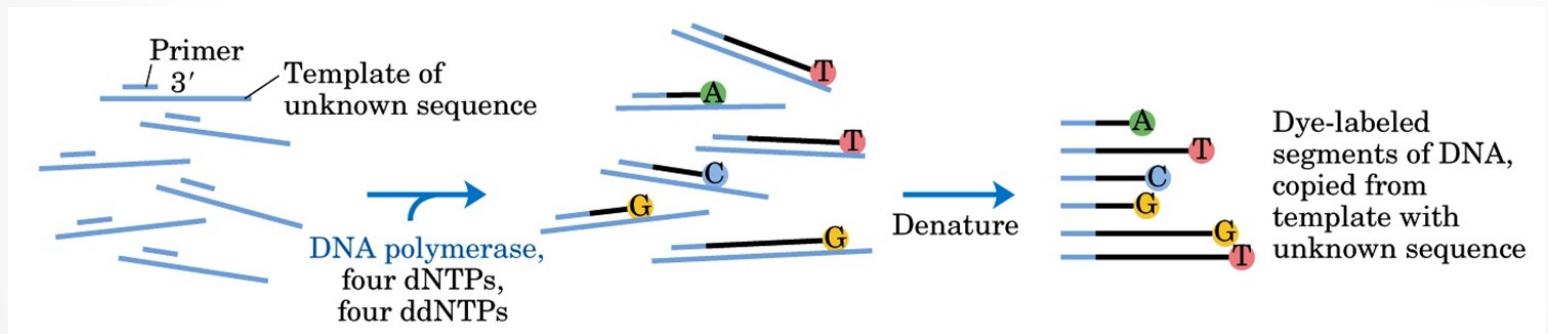
Určení sekvence DNA

- Dideoxy sekvenace
 - Elektroforesa – autoradiografie – 4 dráhy



Určení sekvence DNA

- Dideoxy sekvenace
 - Fluorescenční značení – odlišné pro každý ddNTP
 - Dideoxy (dd)NTP – 1 nádobka
 - Produkty končí danou bází - odlišně fluoreskující
 - CZE v 1 vzorku – automatizace, vícekanálové analýzy

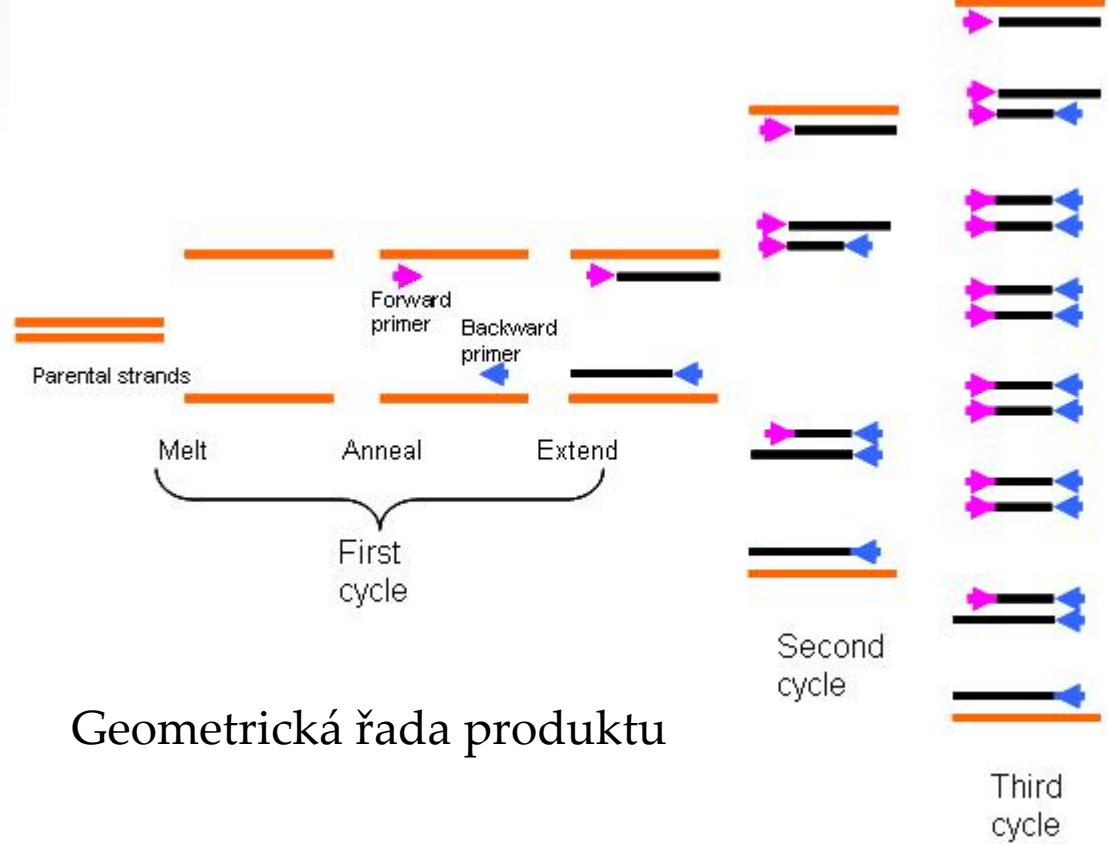


PCR

- Polymerázová řetězová reakce
 - Opakování replikace zkoumaného úseku
 - Cyklická změna T
- Komponenty
 - Taq polymeráza, dNTP, primery, vzorek-templát
 - Termocycler
 - Potřeba primerů
- Kvantitativní PCR
 - RT PCR
- Význam
 - analytický – diagnostika, forenzní analýza,
 - preparativní - pomnožení materiálu, cílené mutace, umělé geny atd.

PCR

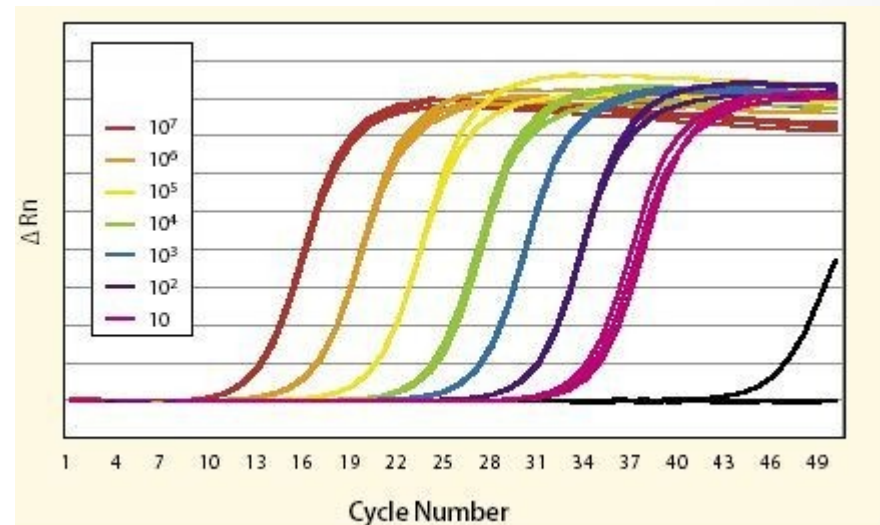
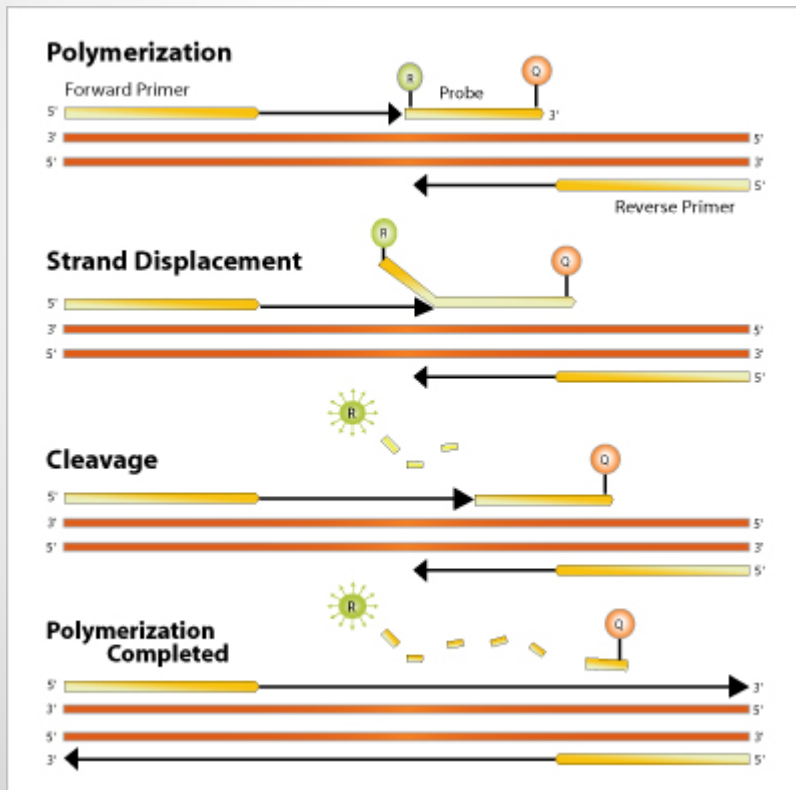
- Schema
- Nadbytek reaktantů
 - dNTP, primery
- Střídání T – cykly
 - Denaturace – ca 95
 - Hybridizace – ca 50
 - Polymerace – ca 65
- Geometrická řada
 - Analýza produktů
- Variace
 - Hybridizace – vliv T



Kvantitativní PCR

- Schéma RT PCR

- Sledování fluorescencí, kvantifikace
- Využití fluorescence, 3'-exonukleasové aktivity Taq polymerasy



Modifikace PCR

- Využití reverzní transkriptázy
- Syntéza cDNA

