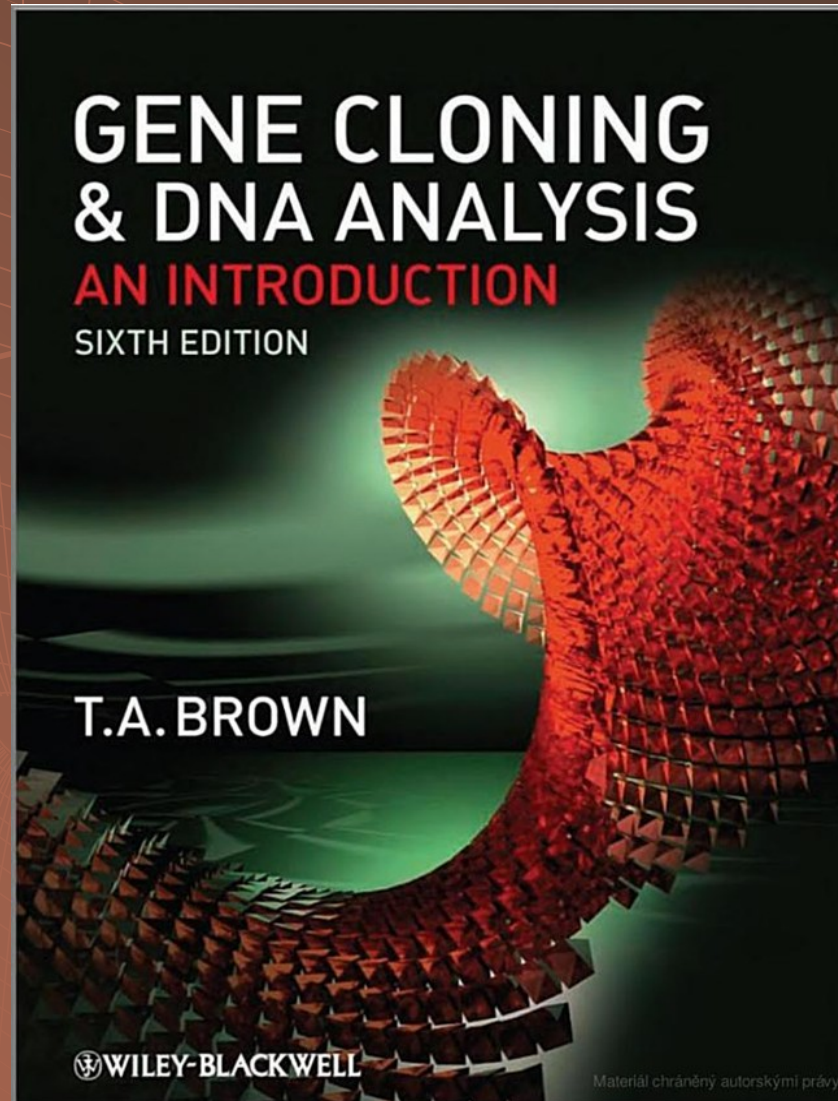


# Analýza a separace nukleových kyselin



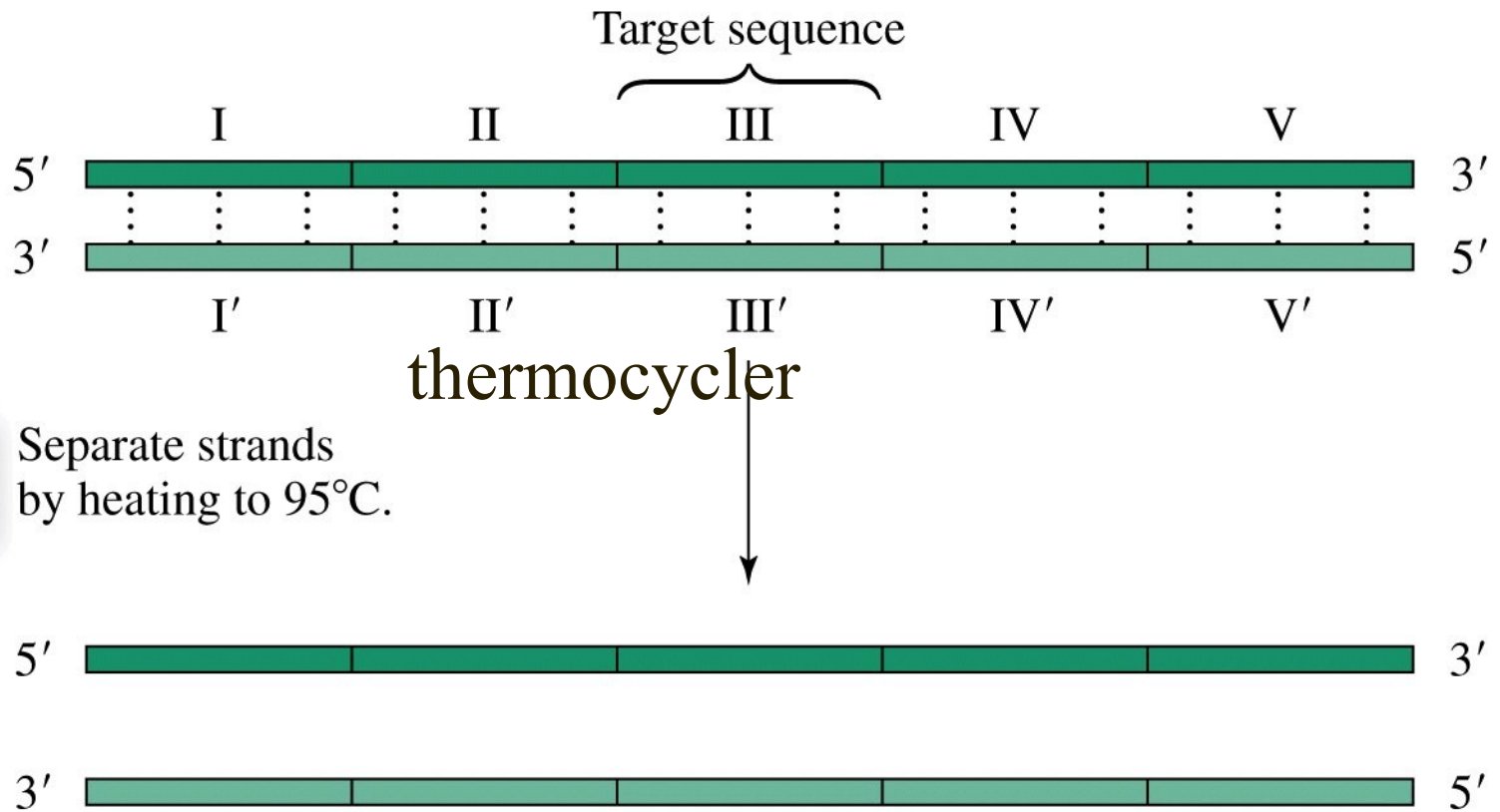
INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

# Literatura



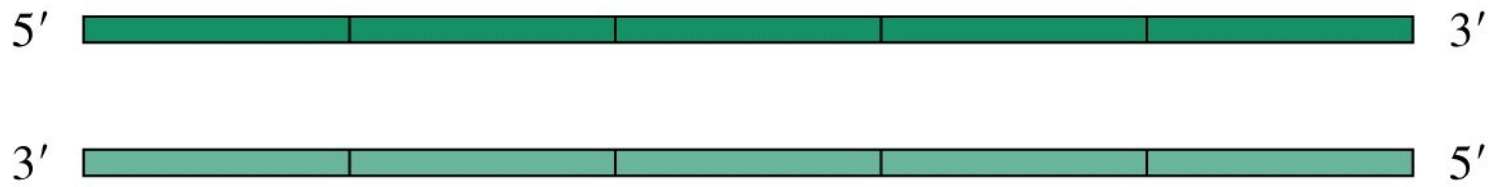
# PCR Mullis 1983 NC 1993

Templátová DNA, primery, NTP, Taq polymeráza (75-80°C)



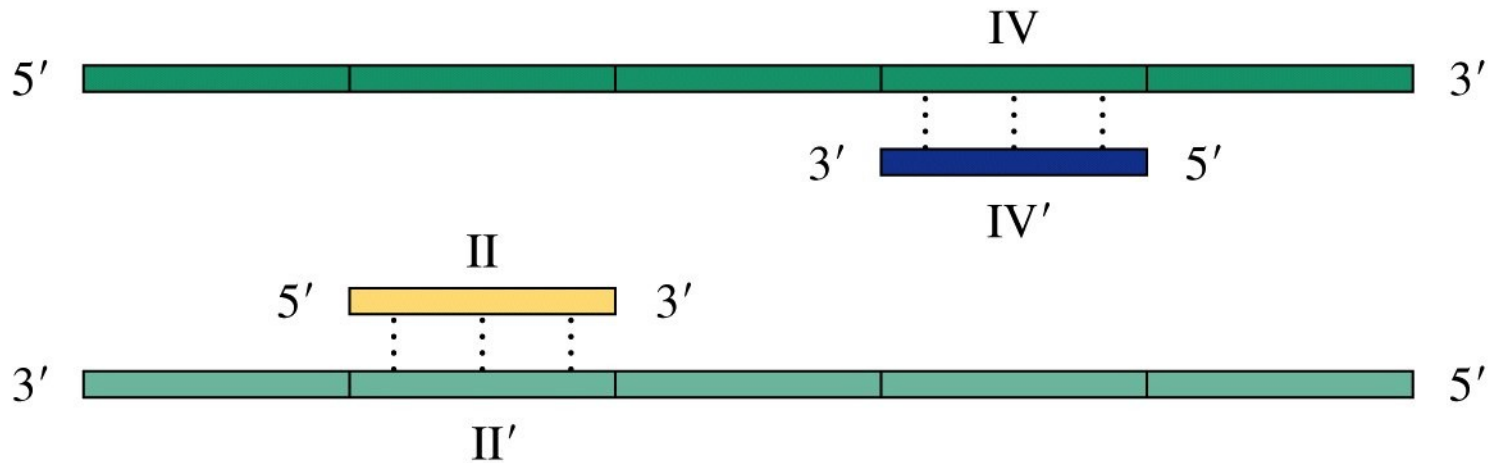
Step 1

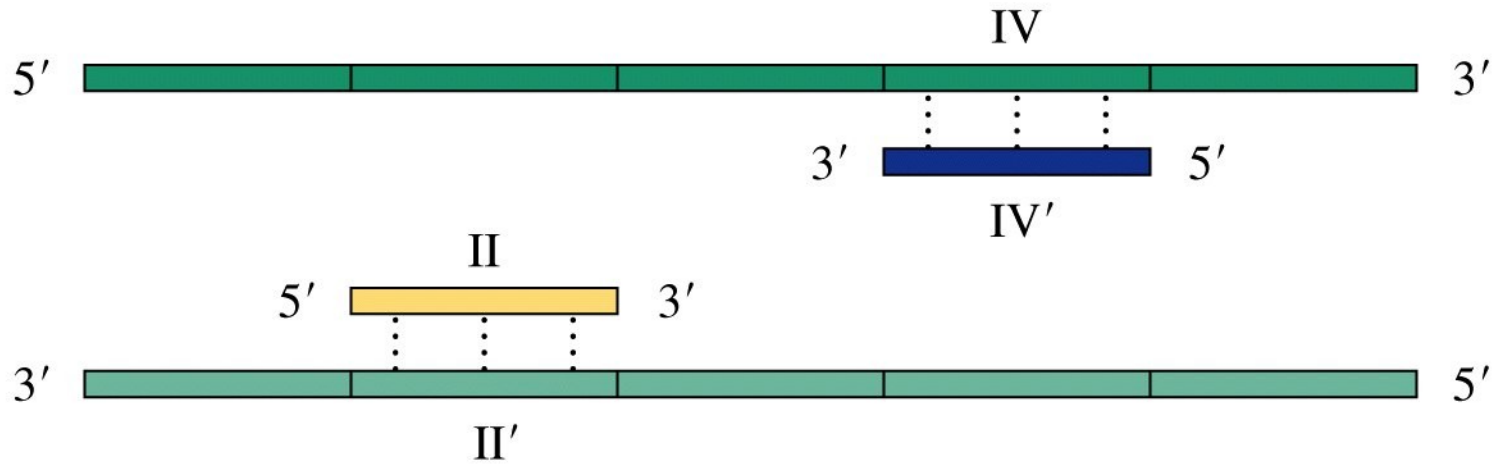
Separate strands  
by heating to 95°C.



Step 2

Hybridize primers by cooling to 50°C.





Step 3

DNA is synthesized by extending the primers at 72°C.

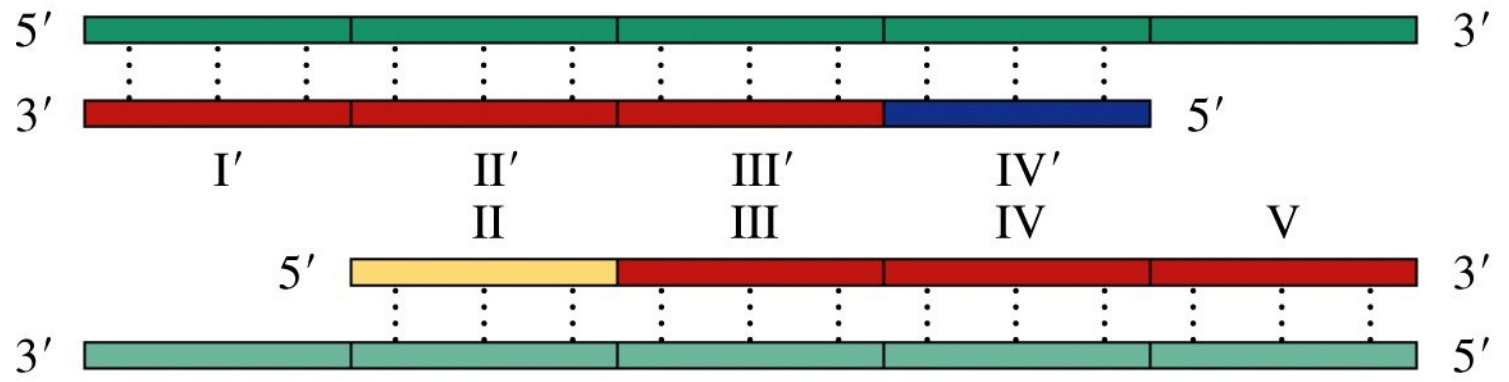
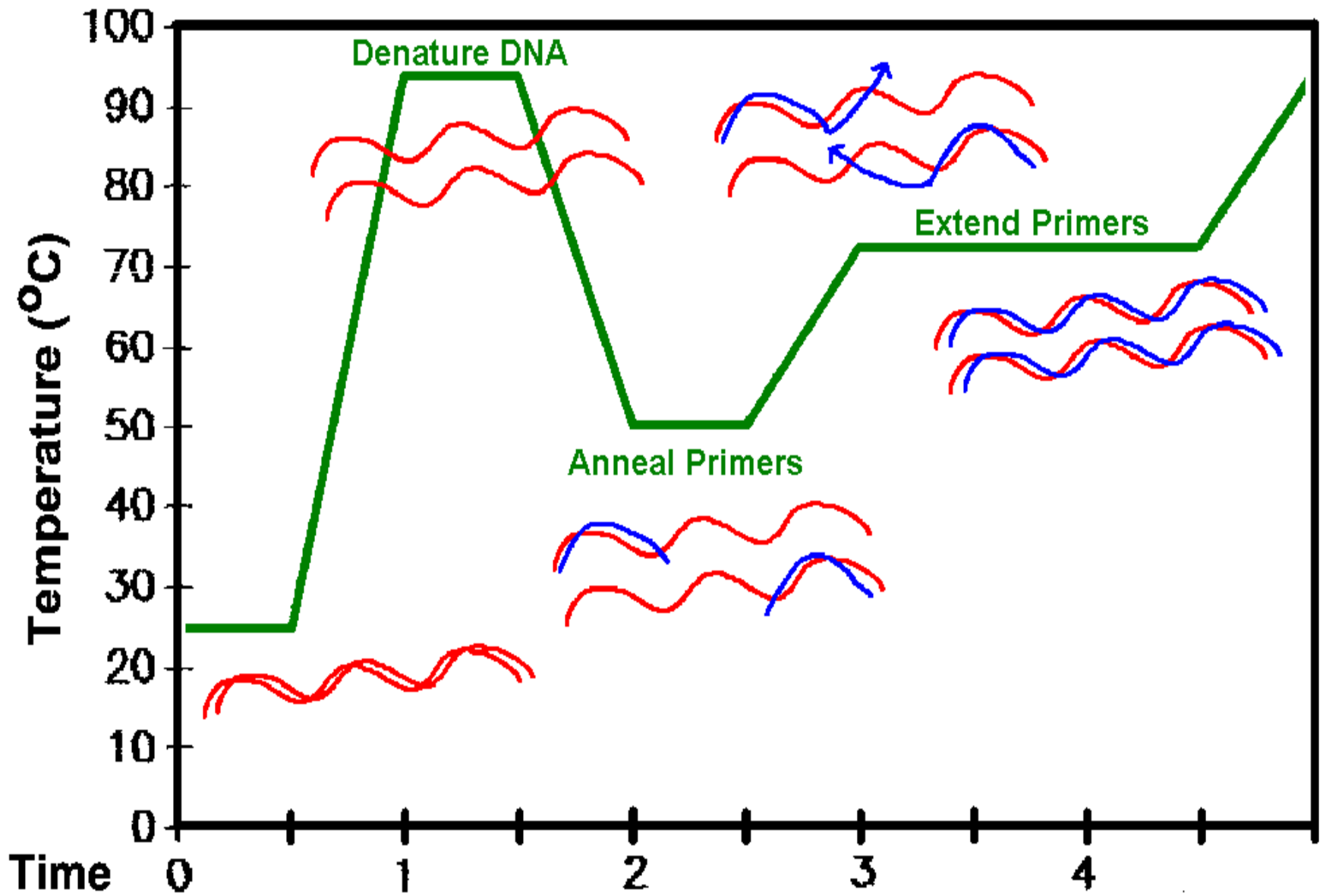
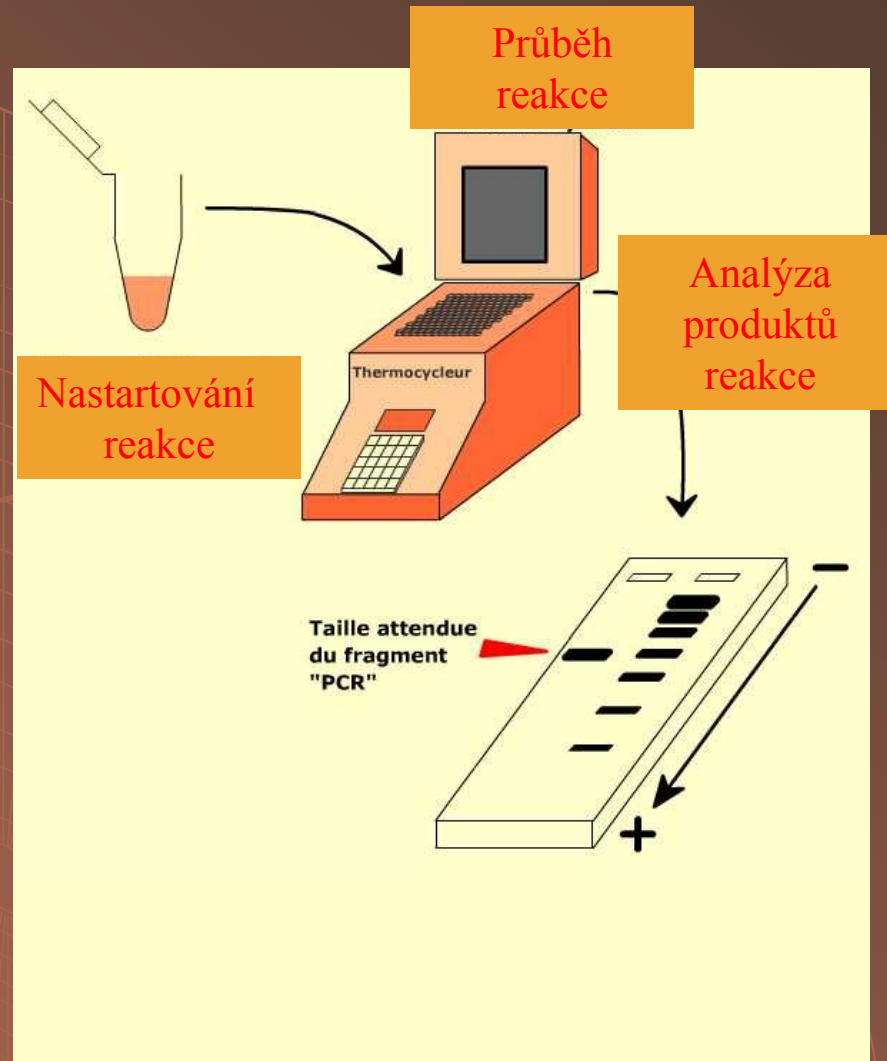


Figure 13-11 part 3 Concepts in Biochemistry, 3/e © 2006 John Wiley & Sons



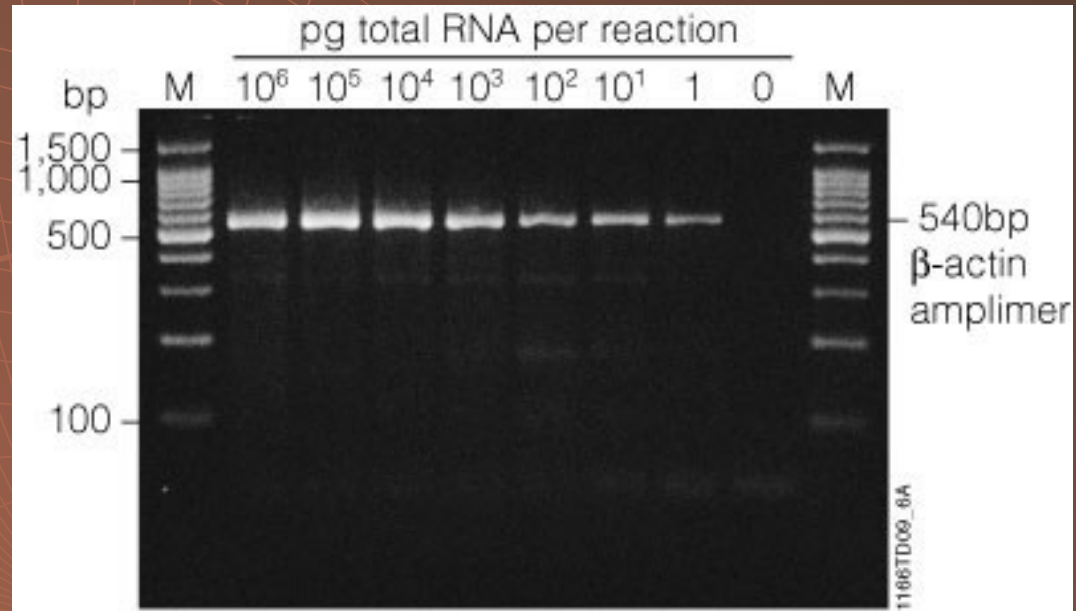




# Thermocycler







# Real time PCR

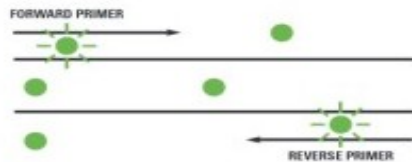
**1. Navázání:** SYBR® Green I se váže během každého cyklu na dvouvláknovou DNA.



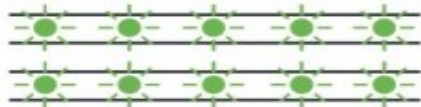
**2. Denaturace:** Ve fázi denaturace DNA je SYBR® Green I uvolněn z vazby na DNA a celková fluorescence dramaticky klesá.



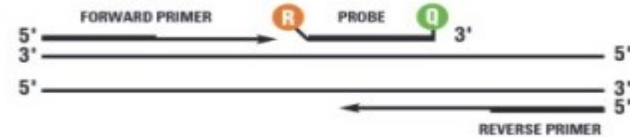
**3. Polymerizace:** Během annealingu primerů a elongace řetězce se Sybr Green opět začíná navazovat na vznikající dvouvláknovou DNA - fluorescence stoupá.



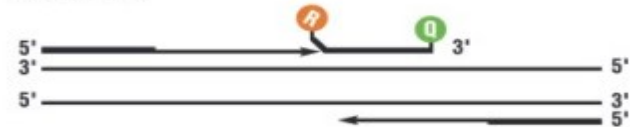
**4. Ukončení polymerizace:** Emitovaná fluorescence dosahuje maxima.



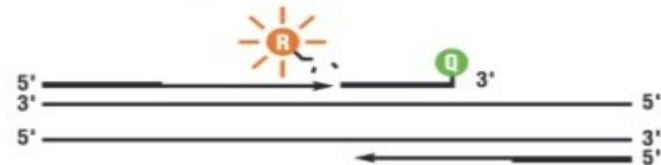
**1. Polymerizace:** Fluorescenční substrát (reporter - R) a jeho zhášeč (Q) jsou navázány na 5' a 3' konce TaqMan sondy.



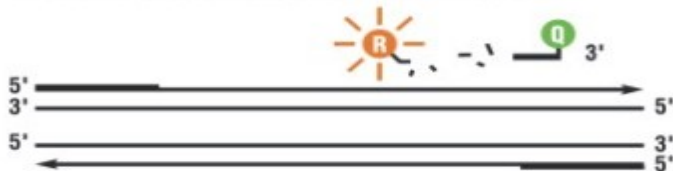
**2. Elongace řetězce:** Dokud je sonda intaktní záření emitované substrátem R je pohlcováno blízkým "zhášečem".



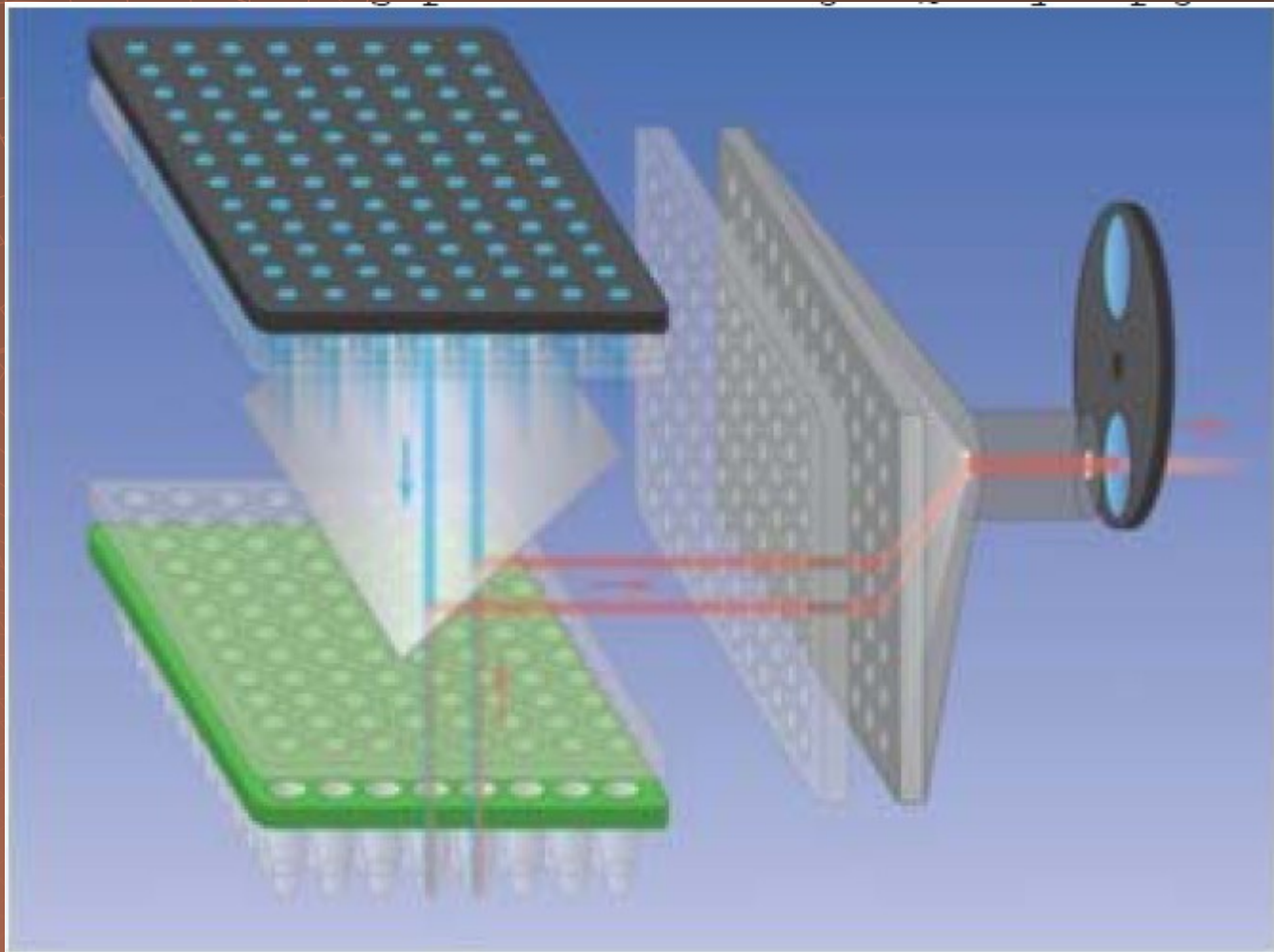
**3. Odštěpení:** když Taq polymeráza dorazí k začátku sondy, postupně ji odchlipuje až odštěpí fluorofor. Ten se tímto oddálí od zhášeče a emitované světlo přestane být pohlcováno - detekovaná fluorescence stoupá.



**4. Polymerizace ukončena:** reporterová barva oddělená od zhášeče emituje charakteristickou fluorescenci.



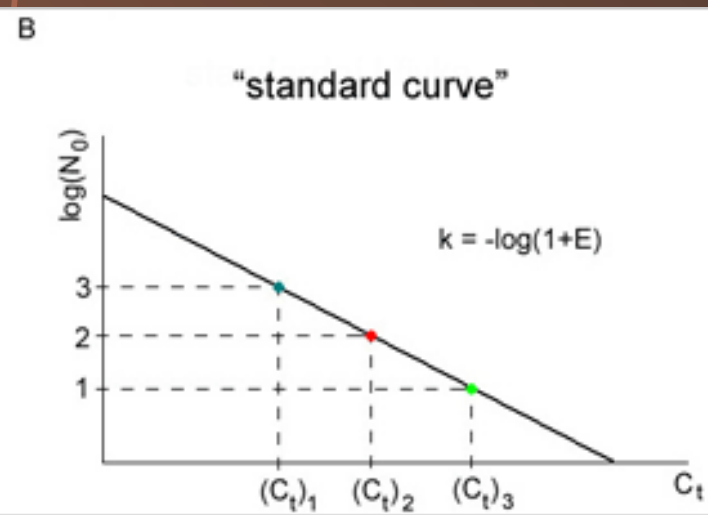
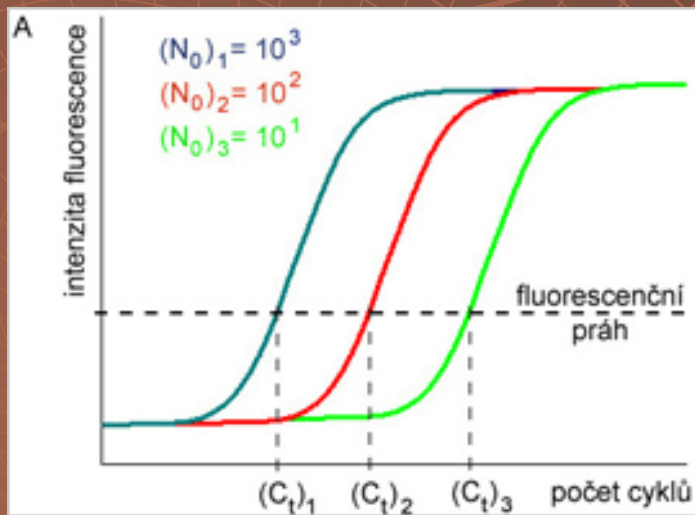
# Real time PCR



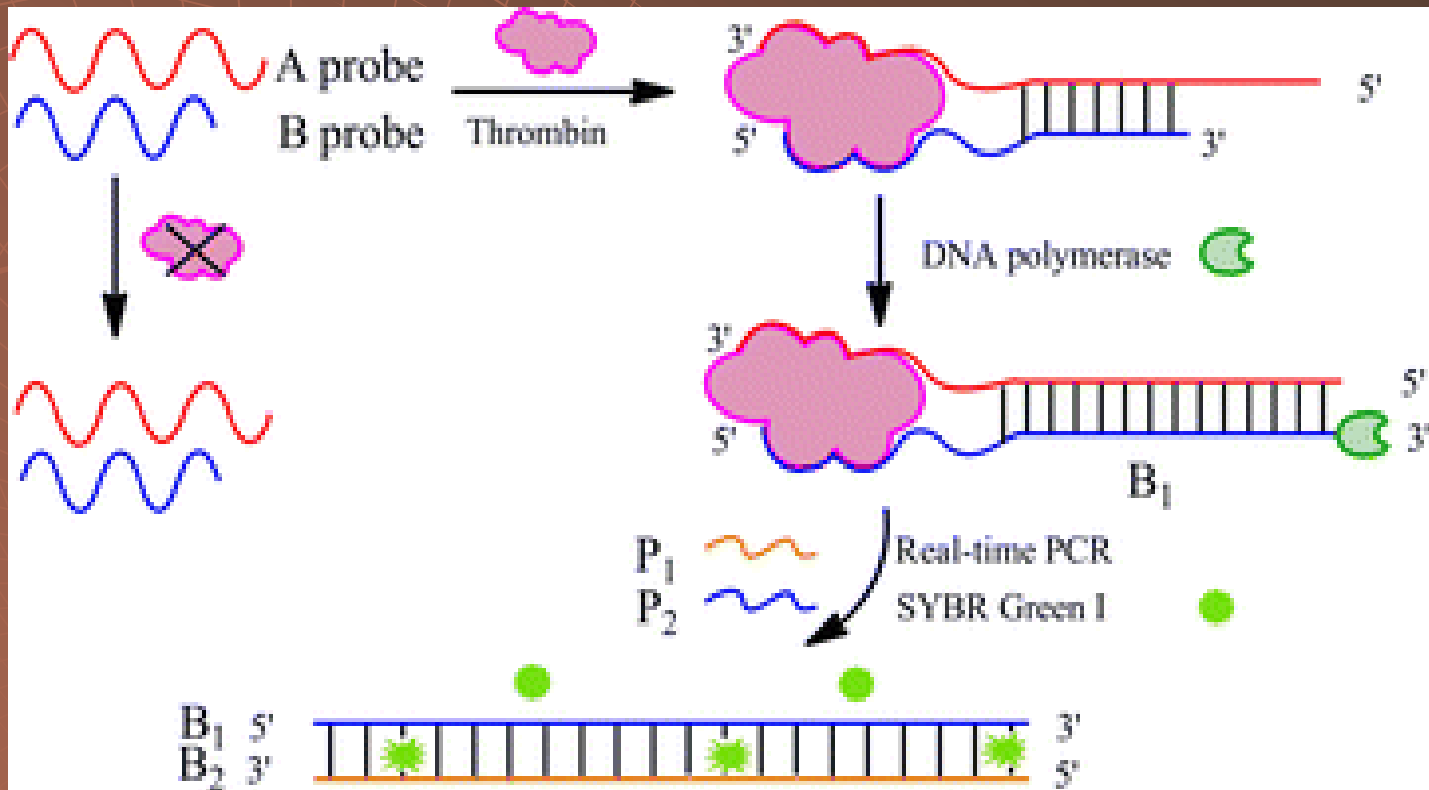


# Real time PCR



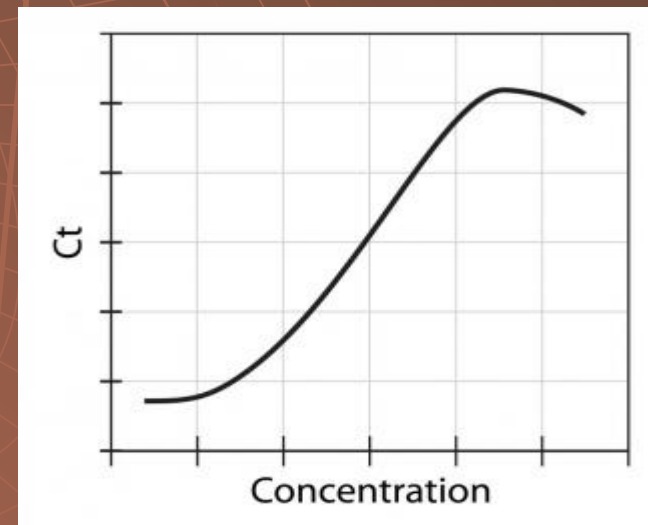
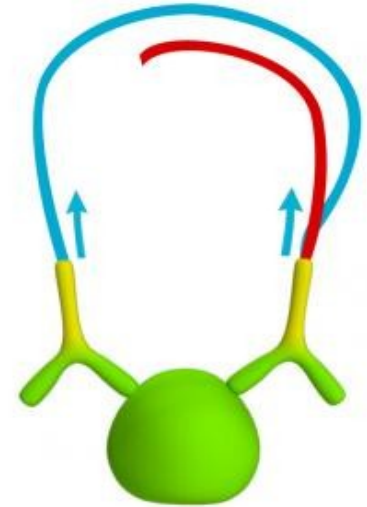
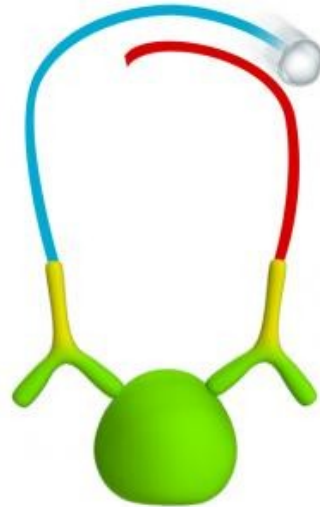
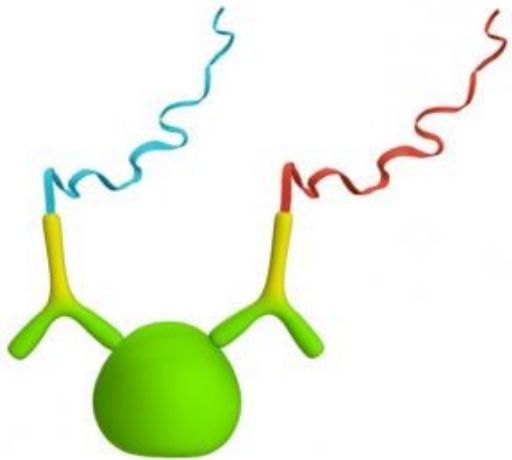


# Real time PCR proteinů





# Real time PCR proteinů



# Stanovení sekvence DNA

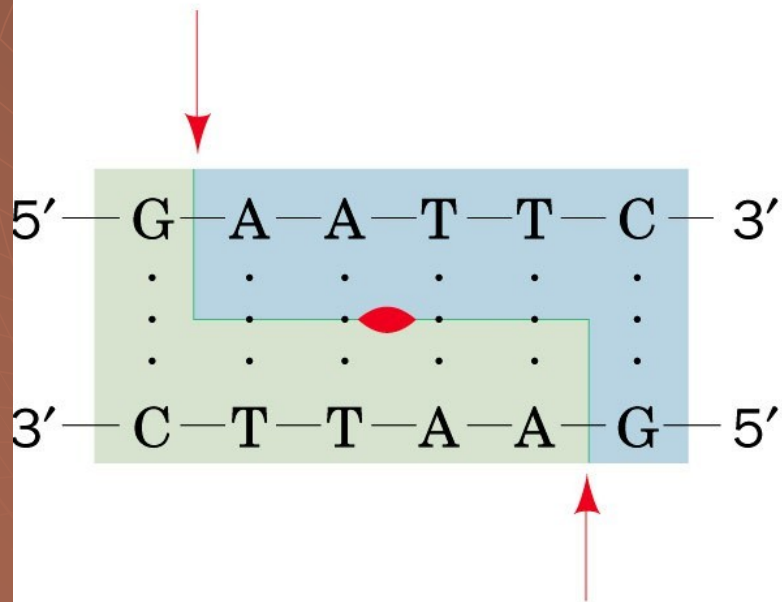
- ◆ Restrikční enzymy
- ◆ Chemické štěpení – Maxam Gilbertovo metoda
- ◆ Enzymová metoda
- ◆ Pyrosekvenování

# Restrikční enzymy

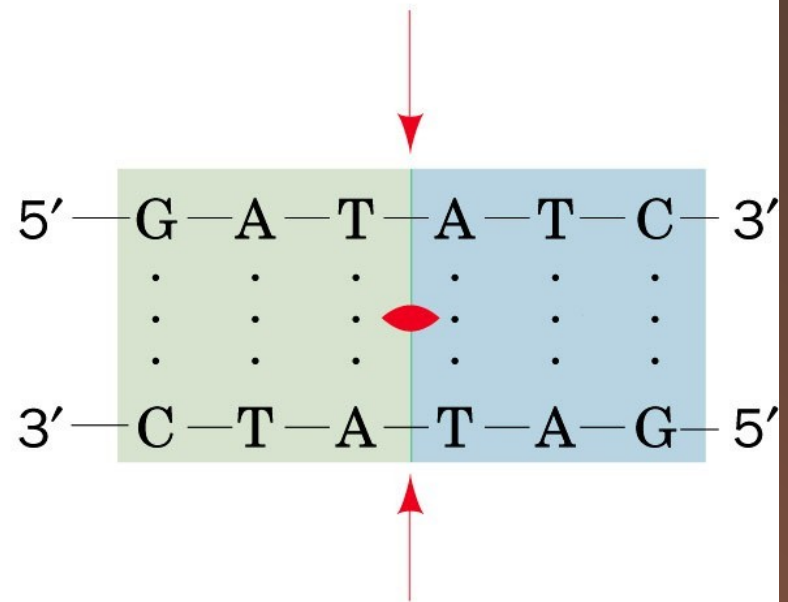
Enzyme	Recognition Sequence*	Microorganism
<i>AhaI</i>	AG↓C* <sup>+</sup> T	<i>Anthrobacter luteus</i>
<i>BamHI</i>	G↓GATC* <sup>+</sup> C	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
<i>BglI</i>	GCCNNNN↓NGCC	<i>Bacillus globigii</i>
<i>BglII</i>	A↓GATCT	<i>Bacillus globigii</i>
<i>EcoRI</i>	G↓AA* <sup>+</sup> TTC	<i>Escherichia coli</i> RY13
<i>EcoRII</i>	↓CC*( <sup>+</sup> )GG	<i>Escherichia coli</i> R245
<i>EcoRV</i>	GA* <sup>+</sup> T↓ATC	<i>Escherichia coli</i> J62 pLG74
<i>HaeII</i>	RGCGC↓Y	<i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>HaeIII</i>	GG↓C* <sup>+</sup> C	<i>Haemophilus aegyptius</i>
<i>HindIII</i>	A* <sup>+</sup> ↓AGCTT	<i>Haemophilus influenzae</i> R <sub>1</sub>
<i>HpaII</i>	C↓C* <sup>+</sup> GG	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>MspI</i>	C* <sup>+</sup> ↓CGG	<i>Moraxella</i> species
<i>PstI</i>	CTGCA* <sup>+</sup> ↓G	<i>Providencia stuartii</i> 164
<i>PvuII</i>	CAG↓C* <sup>+</sup> TG	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>SalI</i>	G↓TCGAC	<i>Streptomyces albus</i> G
<i>TaqI</i>	T↓CGA* <sup>+</sup>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>XhoI</i>	C↓TCGAG	<i>Xanthomonas holcicola</i>

# Restrikční enzymy

(a) *EcoRI*



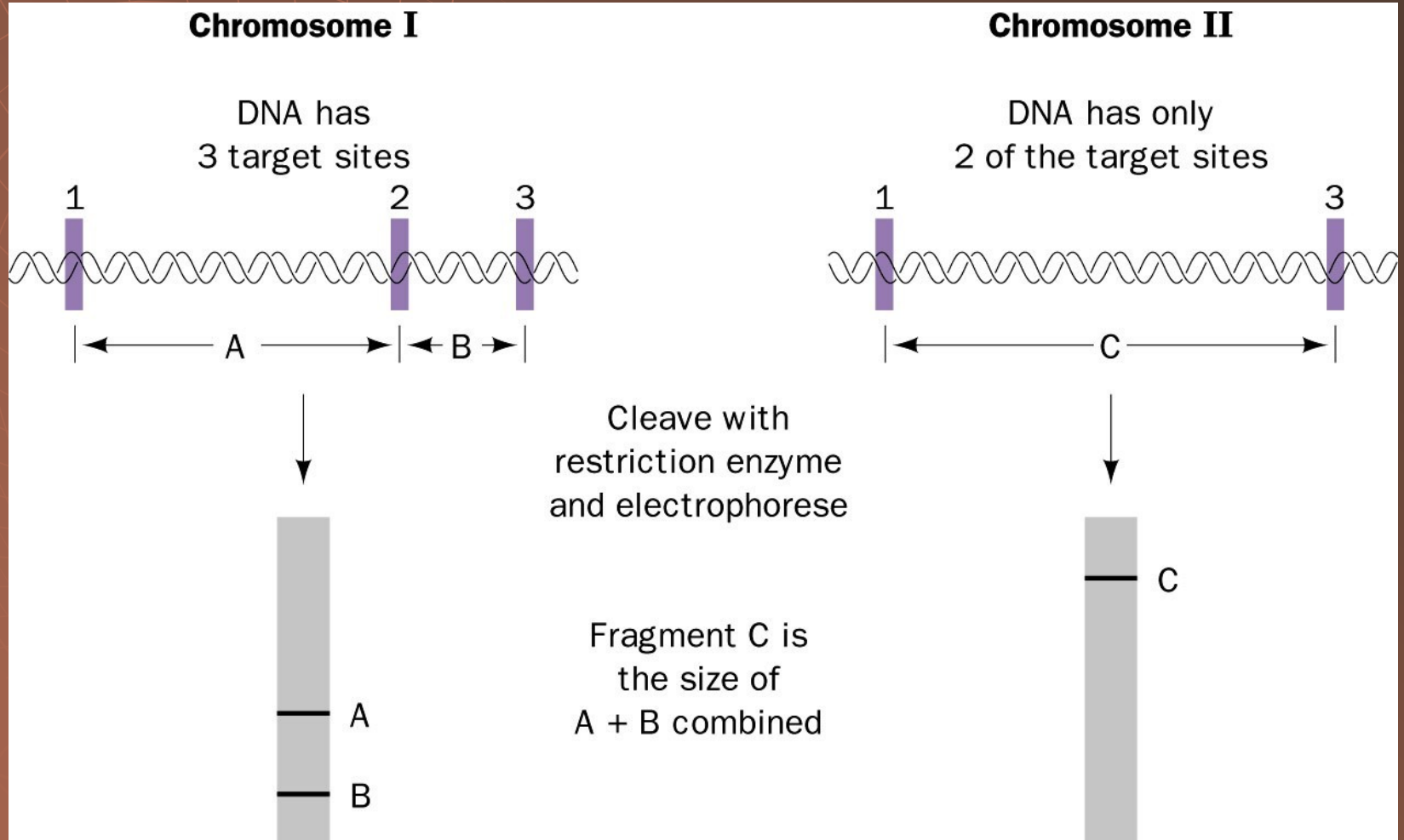
(b) *EcoRV*



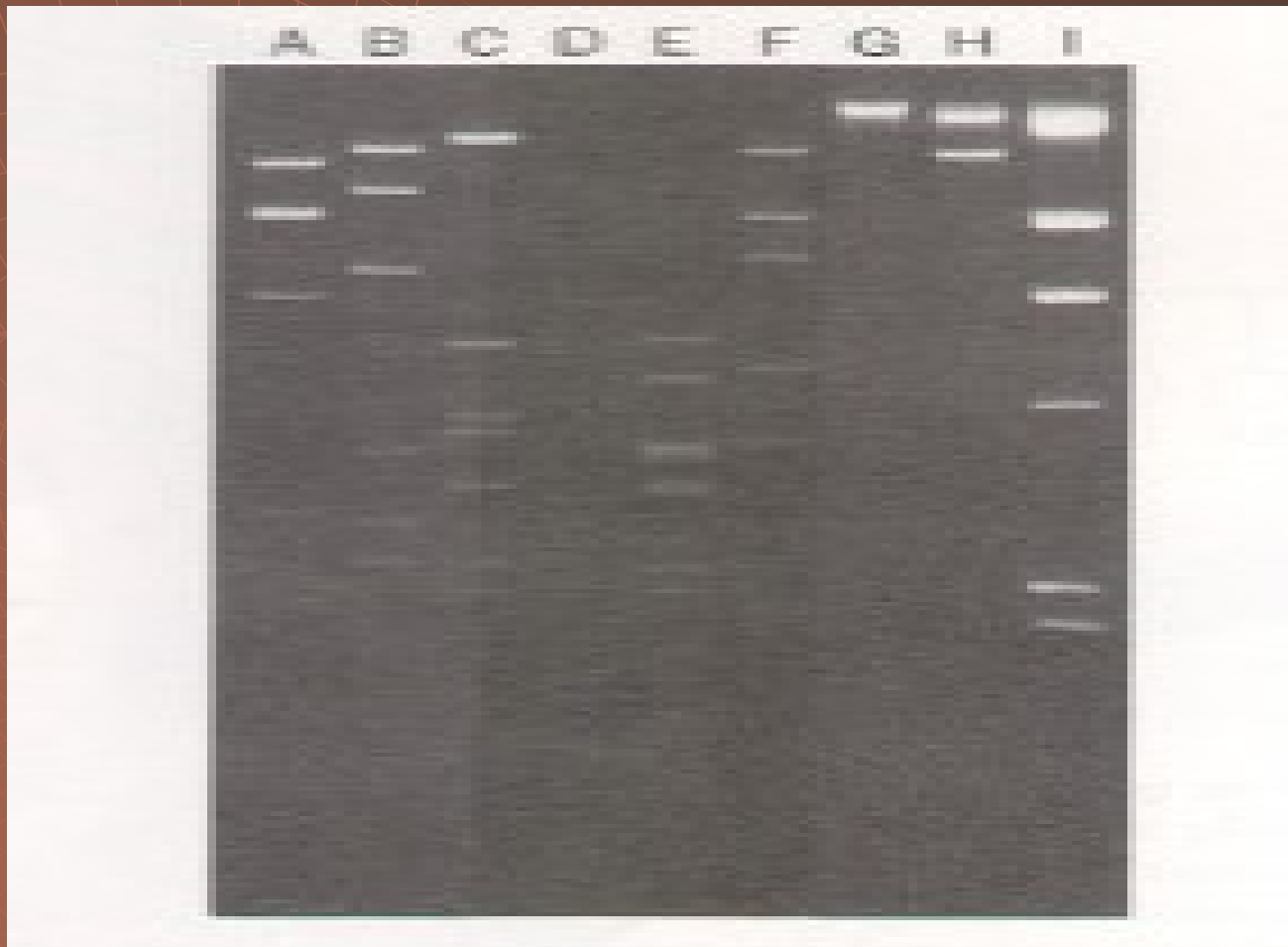
↓ Cleavage site

● Twofold symmetry axis

# Restrikční enzymy



# Restrikční enzymy





# Maxam Gilbertova metoda

## Maxam-Gilbertova metoda

- značení 5' konce  $^{32}\text{P}$
- specifické chemické štěpení
- elektroforéza

# Maxam Gilbertova metoda

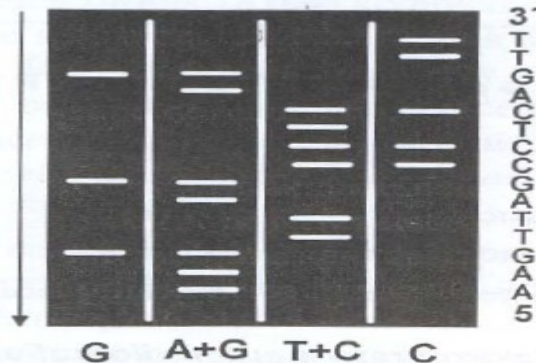


Separace řetězců.



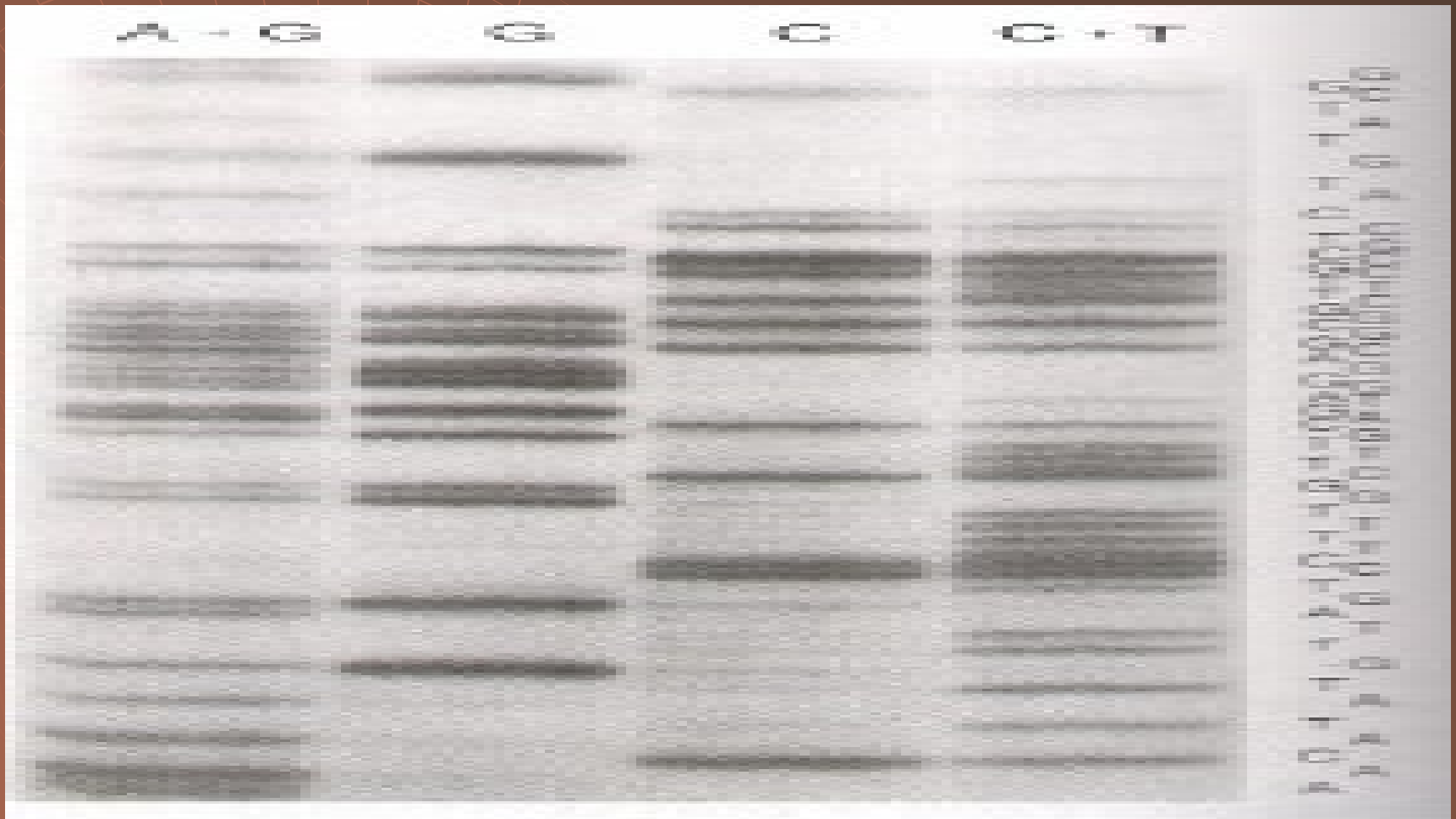
V každé zkumavce je DNA štěpena chemickým činidlem, které selektivně štěpí jeden nebo dva typy bází.

Separace vytvořených fragmentů elektroforézou.



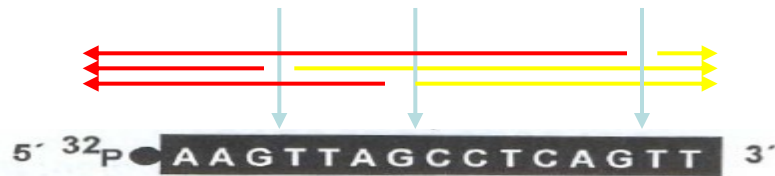
Autoradiografie a odečet sekvence z autoradiogramu.

# Maxam Gilbertova metoda

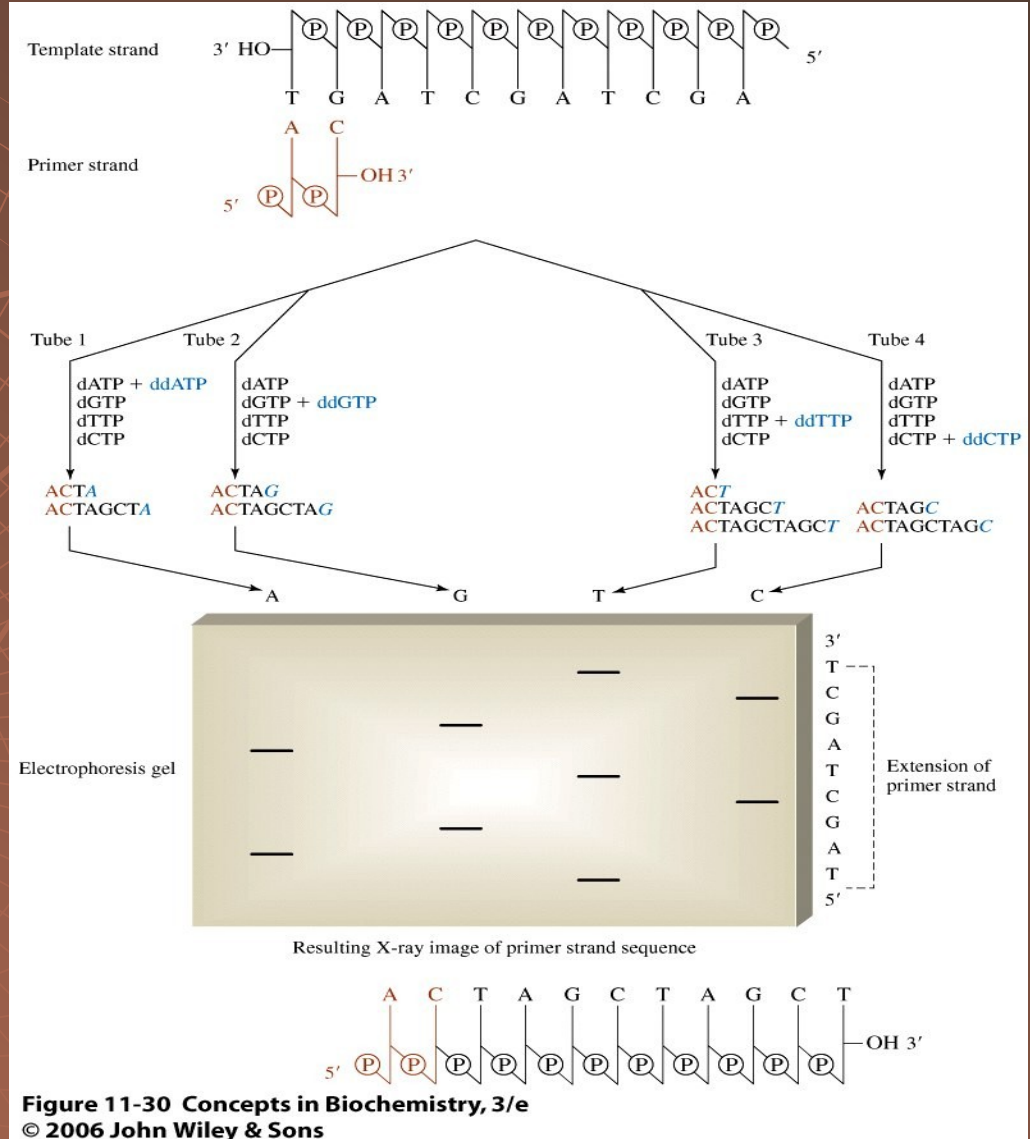
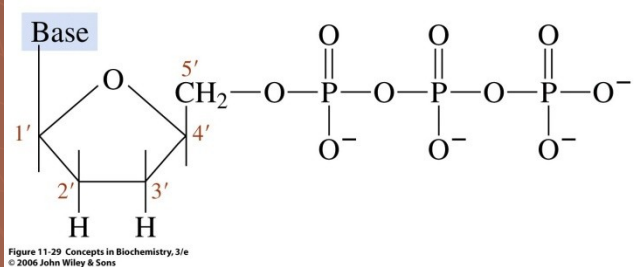


kyselina a piperidin    dimetylsulfát a piperidin    kyselina, NaCl a piperidin    hydrazin a piperidin

# Maxam Gilbertova metoda



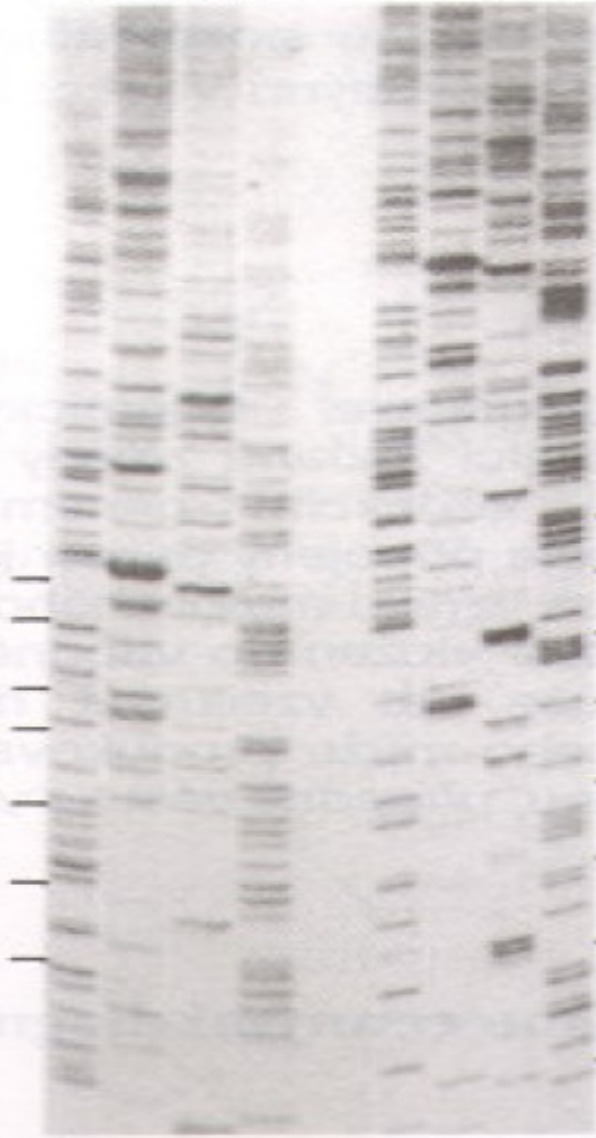
# Enzymová metoda



A G C T

A G C T

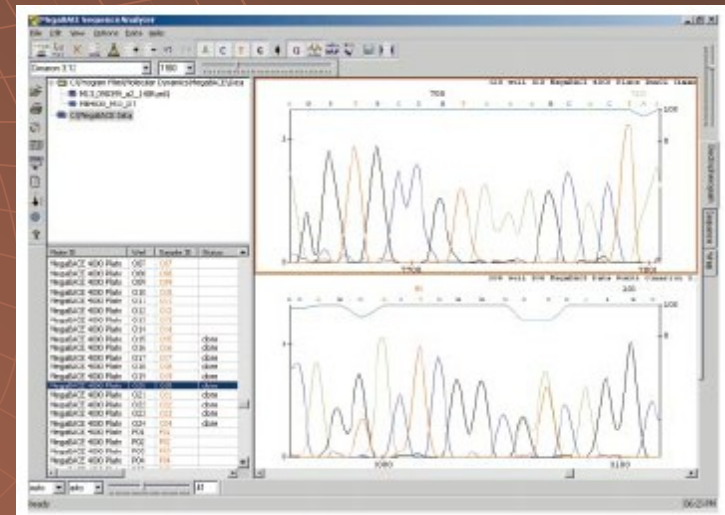
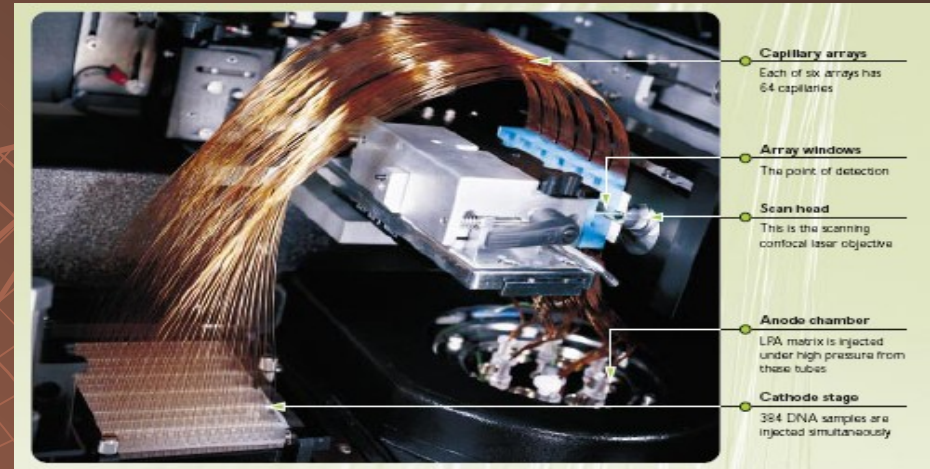
140  
A G G T C C T T G G  
C T T T A T G T A T  
G T A A C A G A A G  
G C A T T T C G C G  
90 A T C T G A C T A T A  
T A A T A A T A T G  
T C C A A G T T T A

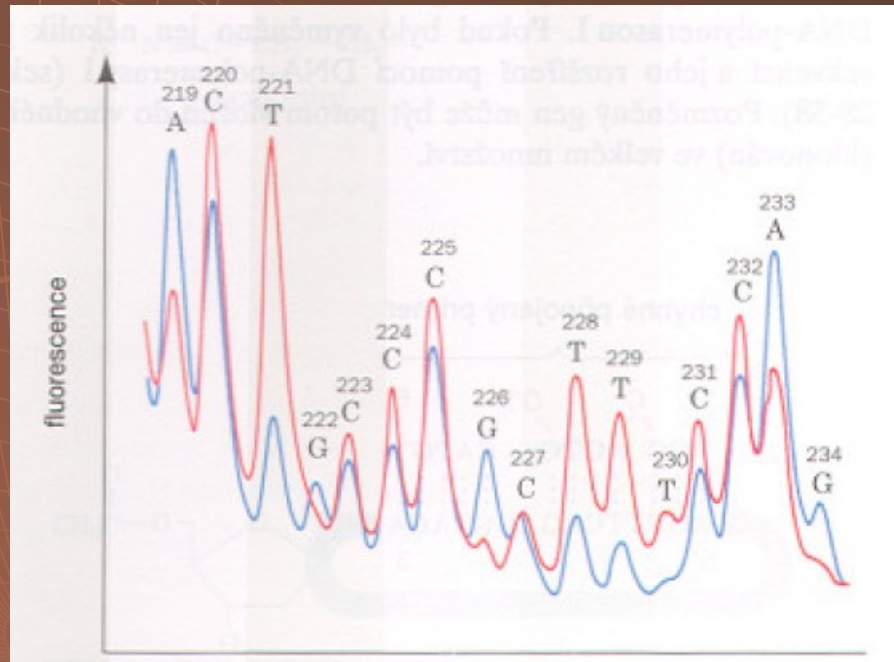


80  
A T T T G A A C C T  
C A G A T A G T A A  
T T C C C T G A A T  
C C T G G G A G T T  
A A C A T C C G A A  
T G A A C T T T T G  
T A C C C A T C A T  
T C G T A C T T G T



# 2003 - Projekt lidského genomu









# Pyrosekvenování

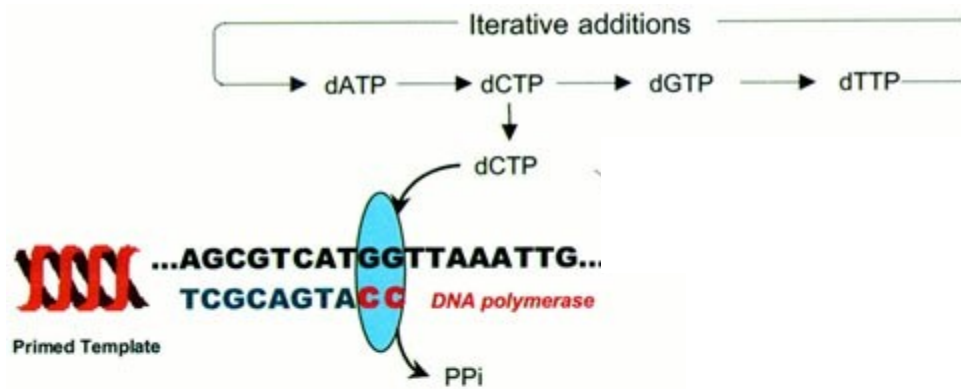
- ◆ První reakcí je DNA polymerace pomocí DNA polymerázy, kdy dochází k zařazení příslušného deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) za uvolnění pyrofosfátu.



- ◆ Vzniklý pyrofosfát je uvolněn z polymerázy a může sloužit jako substrát pro ATP sulfurylázu. Při této reakci dojde ke kvantitativnímu převedení pyrofosfátu na ATP.



# Pyrosekvenování



# Pyrosekvenování

- První reakcí je DNA polymerace pomocí DNA polymerázy, kdy dochází k zařazení příslušného deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) za uvolnění pyrofosfátu.

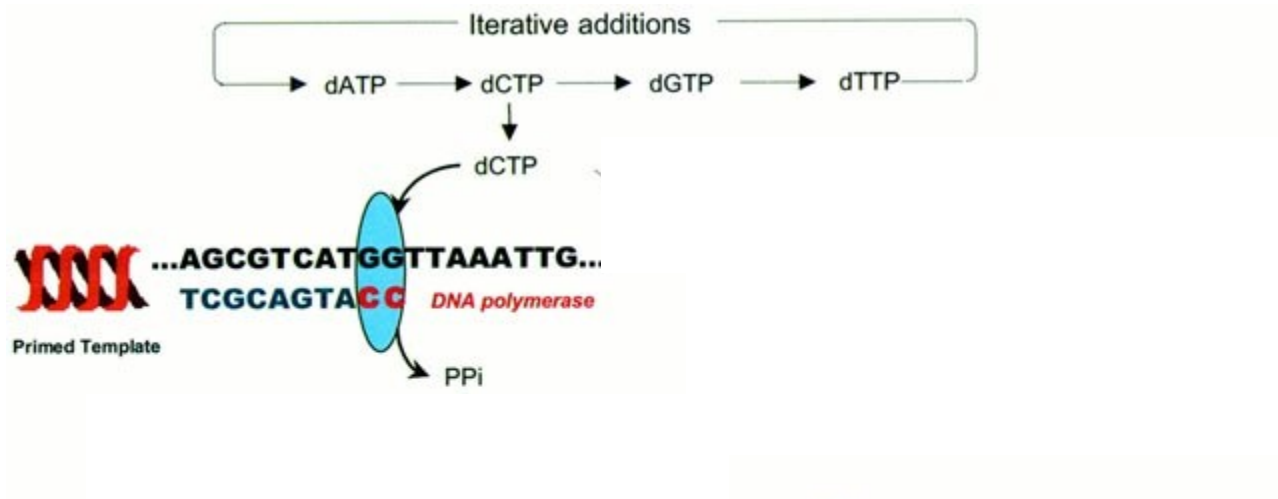


- Vzniklý pyrofosfát je uvolněn z polymerázy a může sloužit jako substrát pro ATP sulfurylázu. Při této reakci dojde ke kvantitativnímu převedení pyrofosfátu na ATP.





# Pyrosekvenování



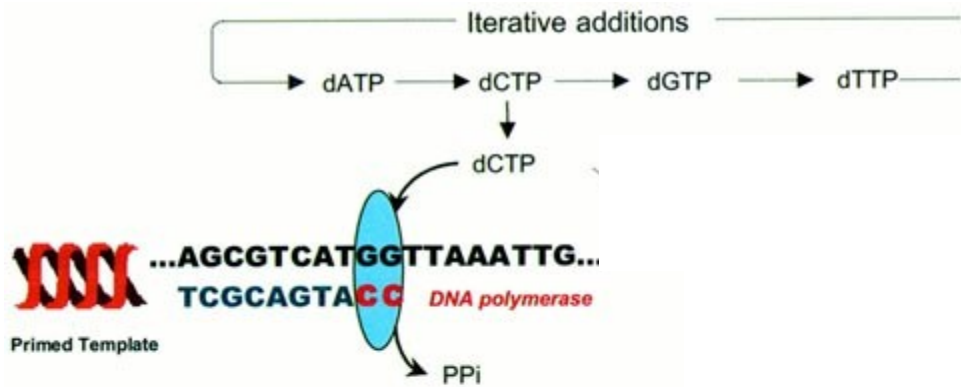
# Pyrosekvenování

- Během třetí a čtvrté reakce je ATP převedeno na světelný signál pomocí enzymu luciferázy a následně je světelný signál detekován a vyhodnocen programem.

Luciferáza + D-luciferin + ATP → Luciferáza-luciferin-AMP + PPi

Luciferáza-luciferin-AMP + PPi + O<sub>2</sub> → Luciferáza + Oxyluciferin + AMP + CO<sub>2</sub> + světlo

# Pyrosekvenování

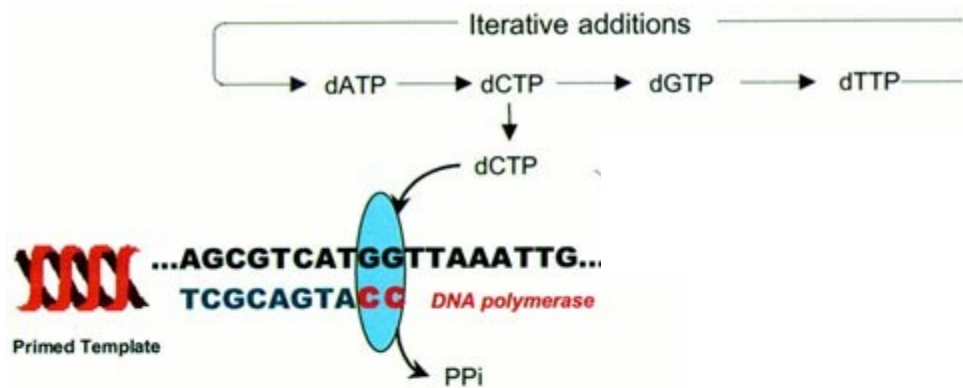


# Pyrosekvenování

- Poslední enzymatickou reakcí je reakce apyrázy, která odstraní neinkorporované nukleotidy a ATP, aby následně mohlo dojít k zopakování celého výše popsaného procesu a mohlo být analyzováno zařazení dalšího nukleotidu. Tato degradace je nezbytná, aby bylo zajištěna synchronizace mezi syntézou a detekcí světelného signálu.

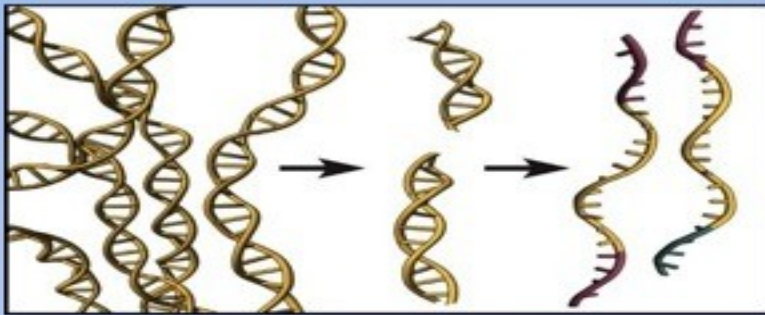


# Pyrosekvenování

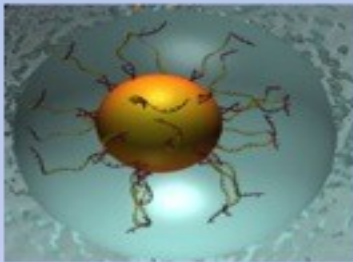


# Pyrosekvenování

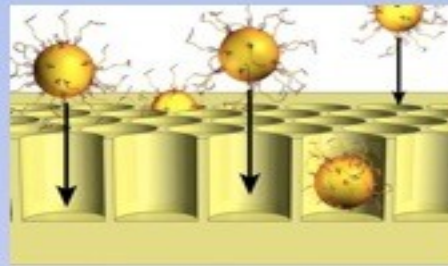
## Process Overview



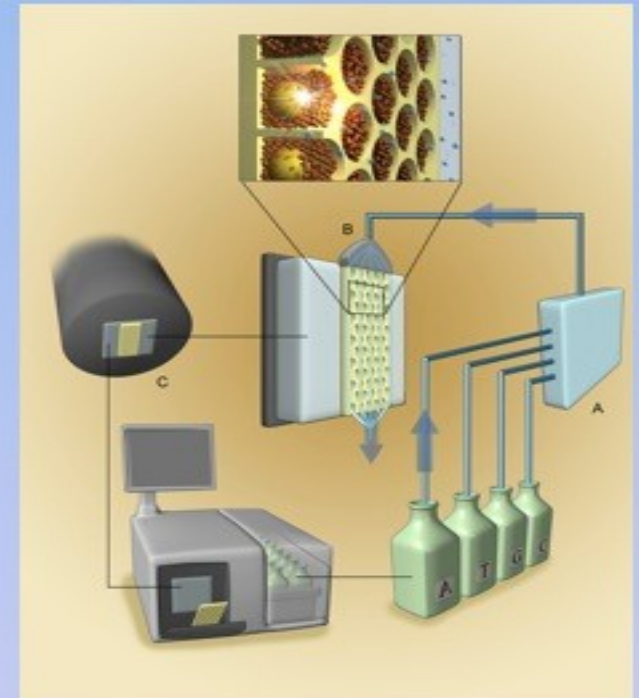
1) Prepare Adapter Ligated ssDNA Library



2) Clonal Amplification on 28  $\mu$  beads



3) Load beads and enzymes in PicoTiterPlate™



4) Perform Sequencing by synthesis on the 454 Instrument



# 454 pyrosekvenování

Technologie využívá paralelní sekvenace: více než

-2 milion sekvencí zároveň.

-Lze získat až 1GB (gigabázi) informace během jedné analýzy (cca4.5 h).

Využití:

-sekvenace genomů (náhodně naštěpená genomová DNA je sekvenována a sestavena)

- studium metagenomů (tj. souhrn všech genů, přítomných v daném prostředí, používá se DNA extrahovaná ze vzorku půdy, vody, sedimentu, mikroflóry střeva ad.)

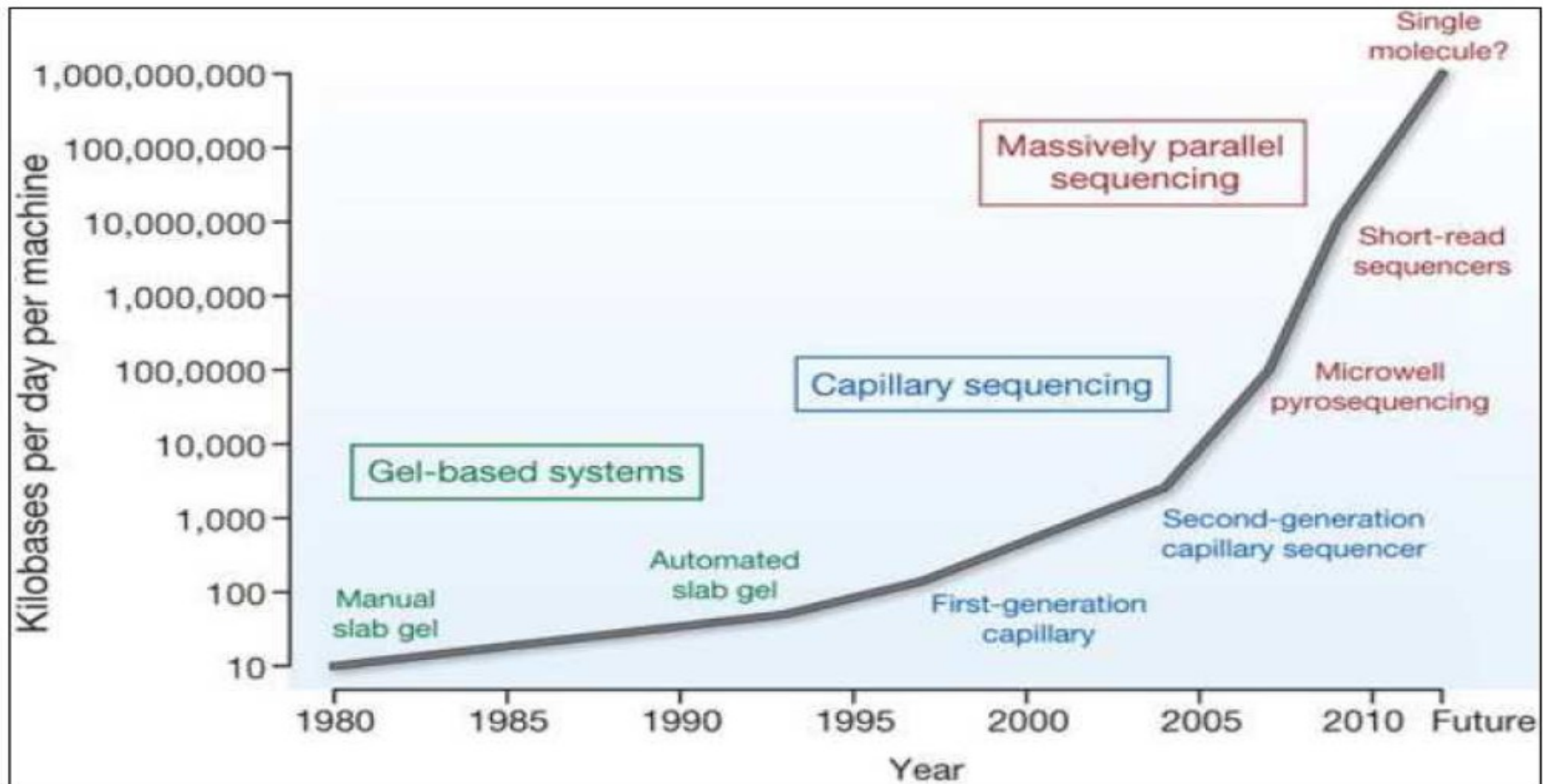
- tzv. ampliconové sekvenování. Vlastní sekvenaci předchází PCR zacílená na 16S nebo 18S geny prokaryot a eukaryot

- analýza typu „shotgun“ – veškerá DNA / RNA, získaná ze vzorku

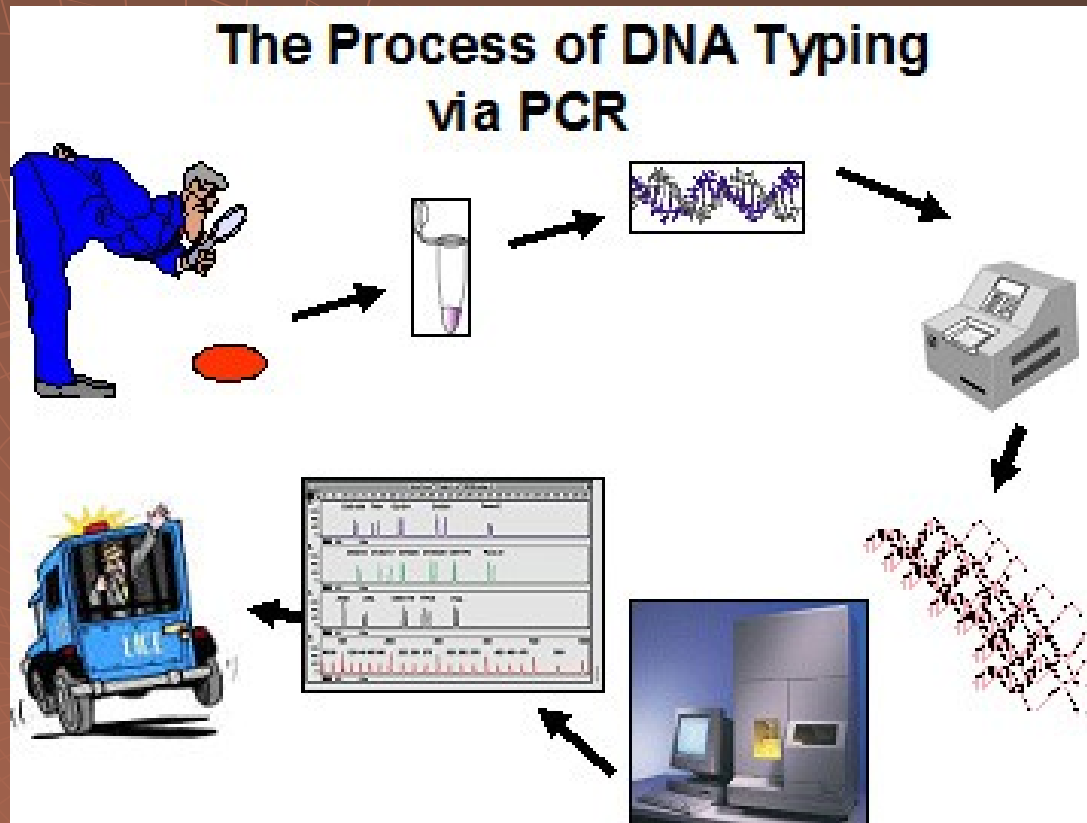


Zařízení je velmi nákladné (cca 17 mil. Kč), analýzy jsou ale dostupné komerčně, takže většina laboratoří v současnosti využívá služeb externích sekvenačních středisek.

# Sekvenování

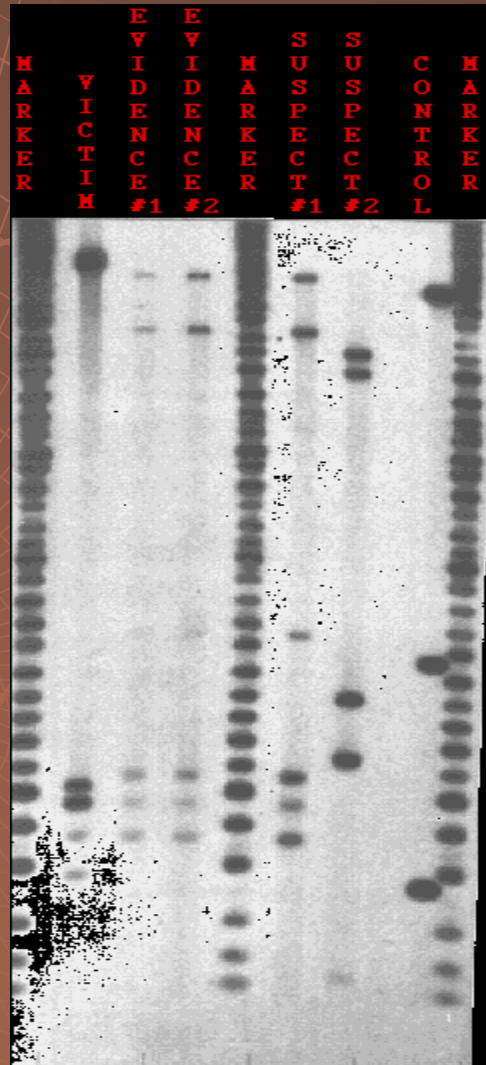


# Genetická daktyloskopie

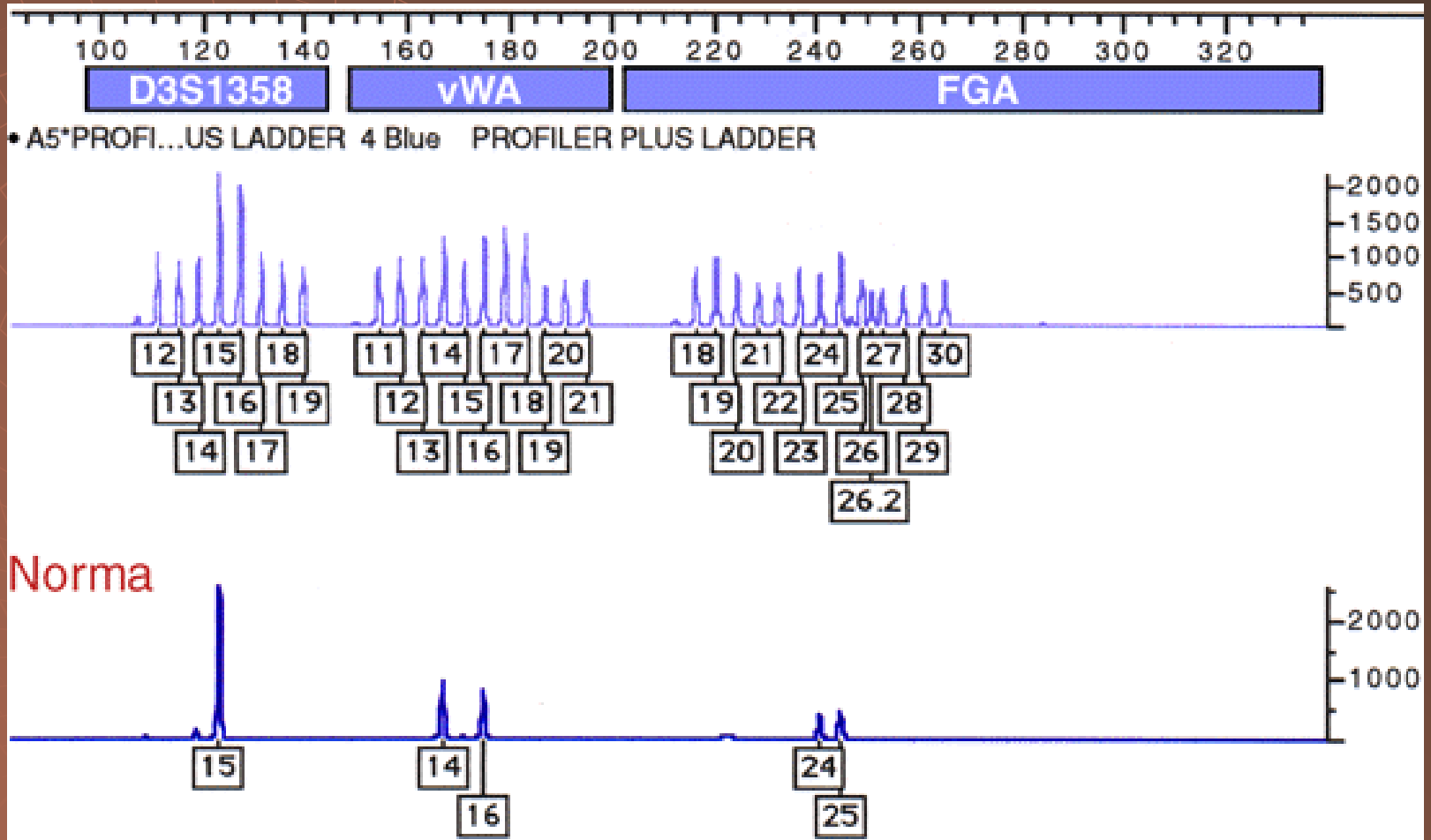


# Použití restrikčních enzymů - RFLP

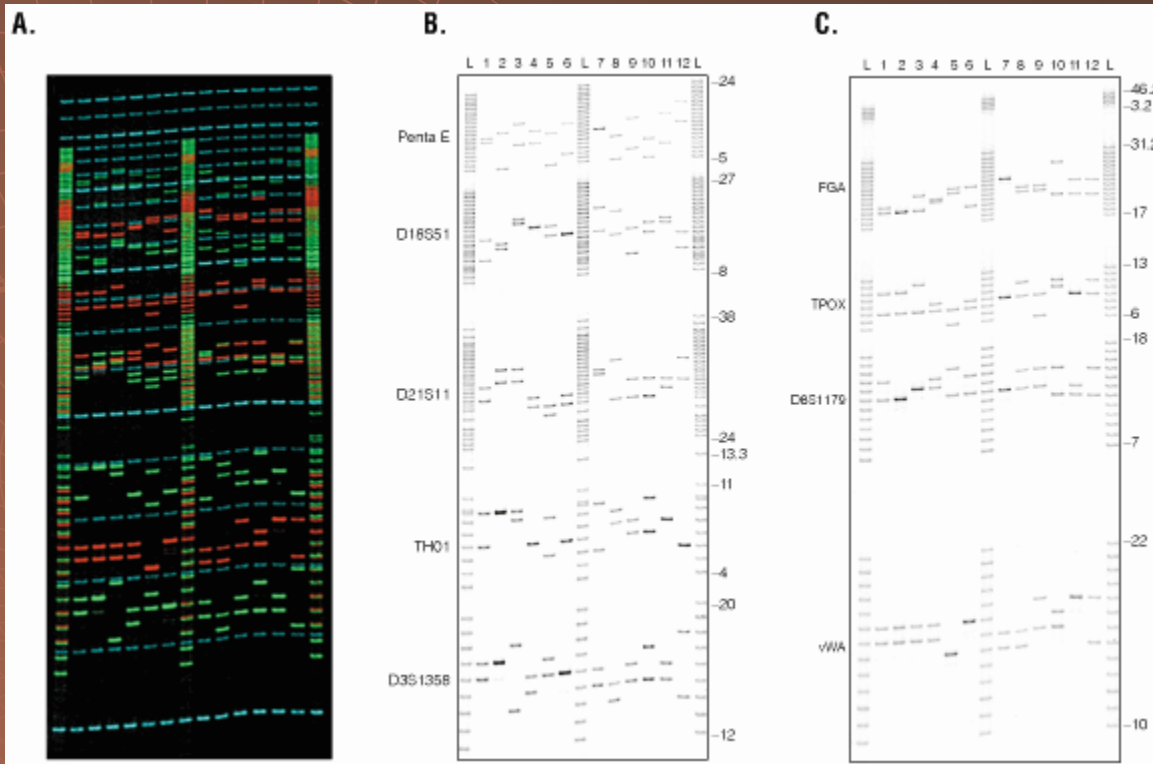
## Restriction Fragment Length Polymorphism



# Short tandem repeats

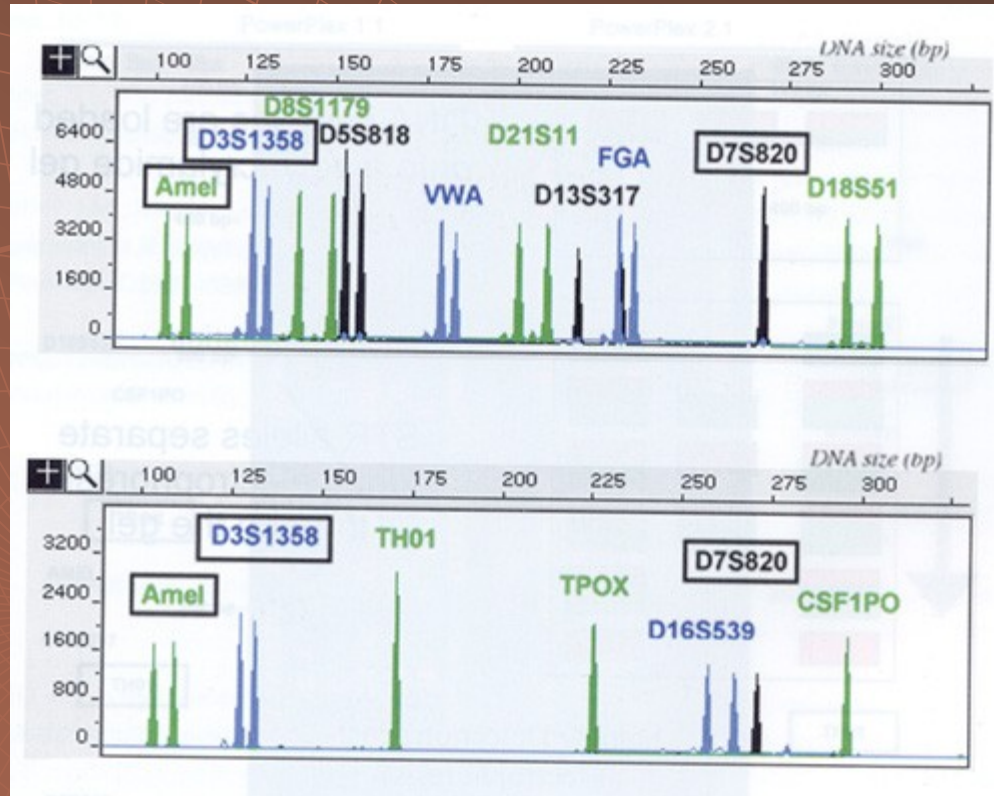


# Short tandem repeats





# Short tandem repeats

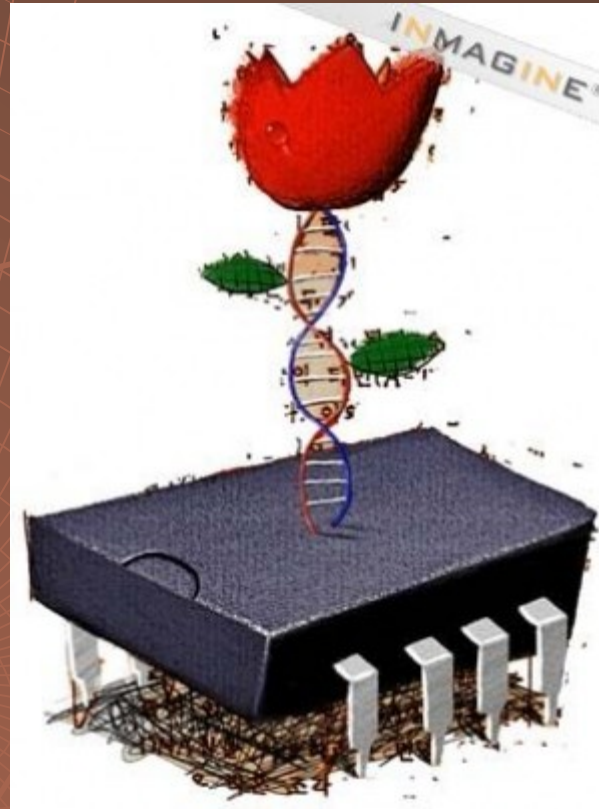


# Testy paternity

## Zjednodušené testy

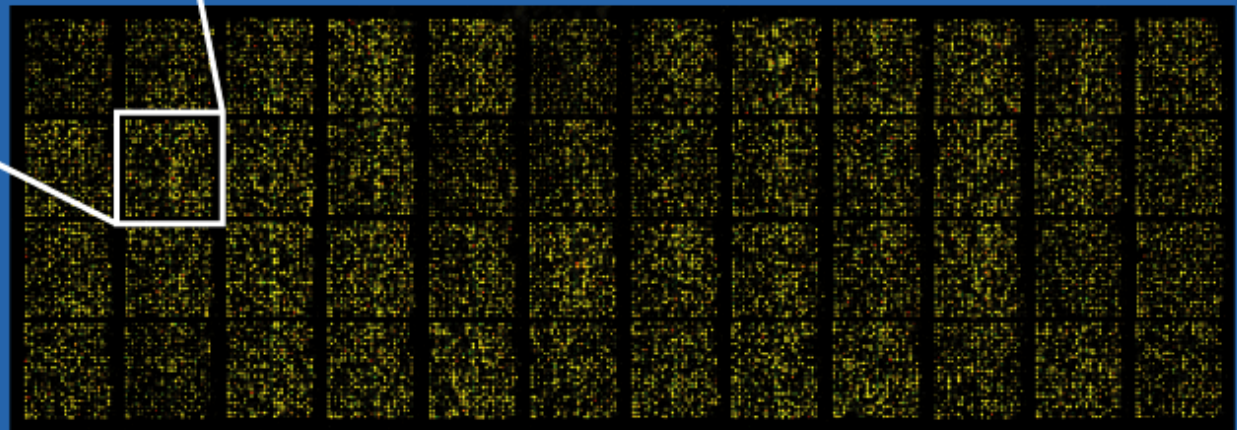
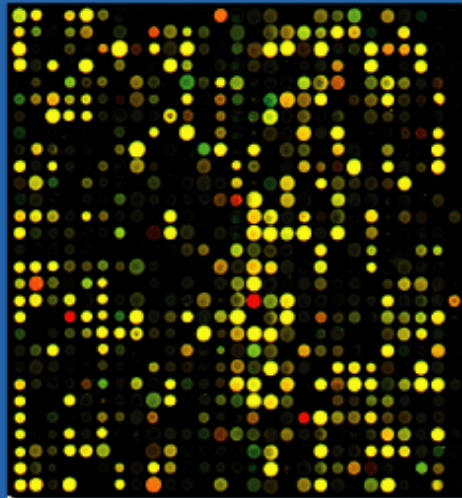
- ◆ STR na Y chromosomu – mužských potomků srovnání s otcem
- ◆ Mitochondriální DNA – dědí se po matce – matroklinní dědičnost

# DNA chipy

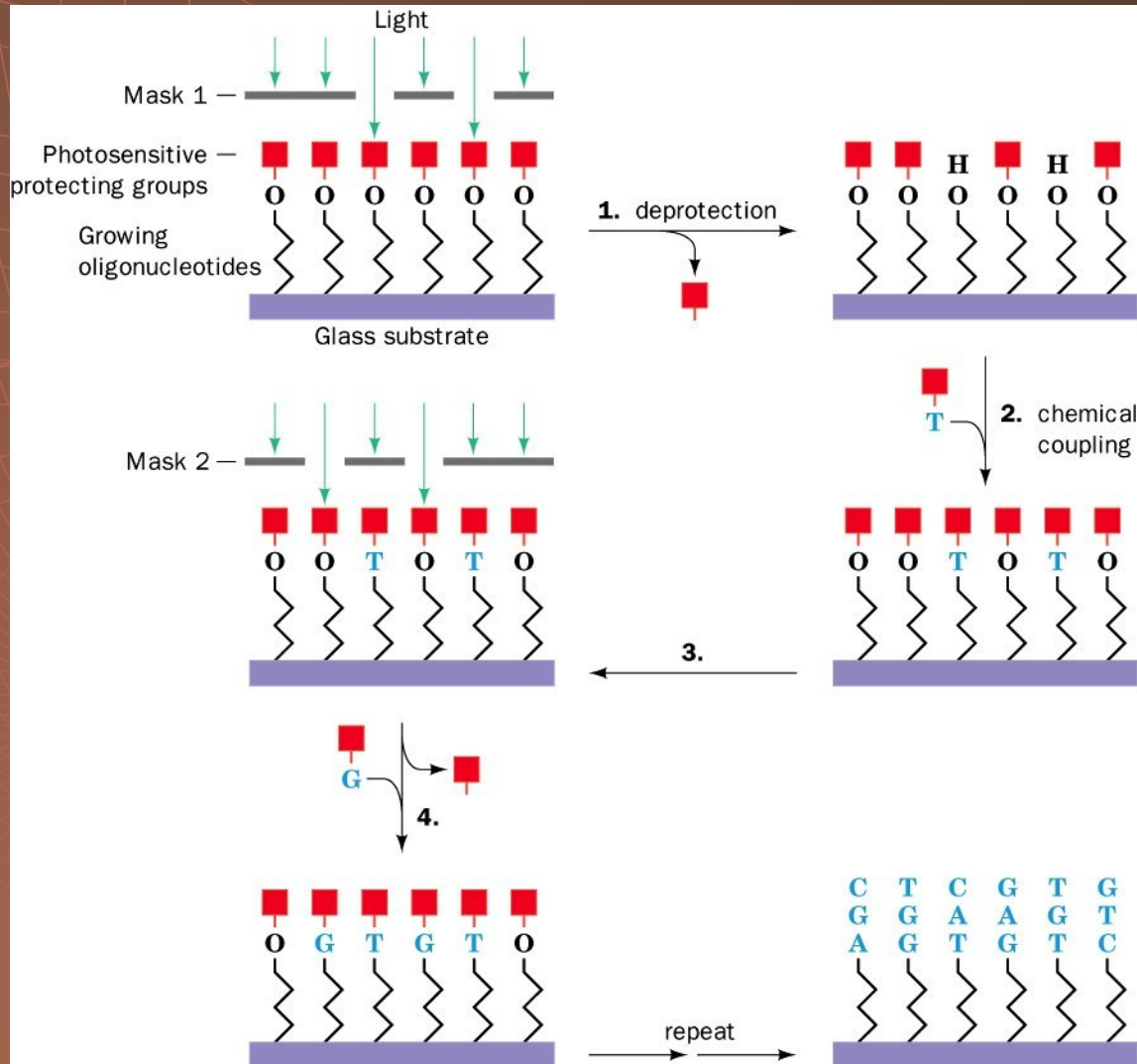




# DNA chipy

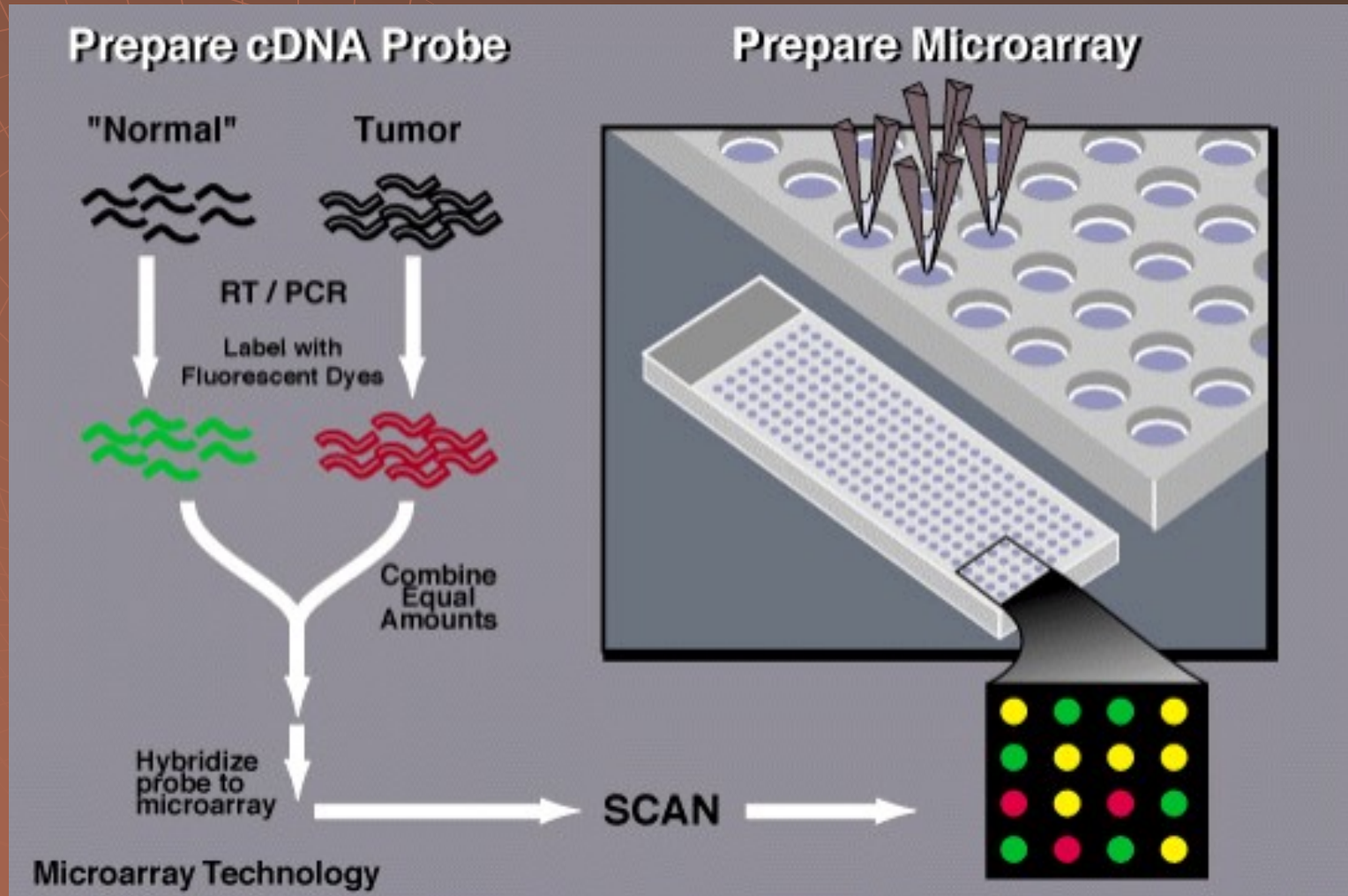


# DNA chipy

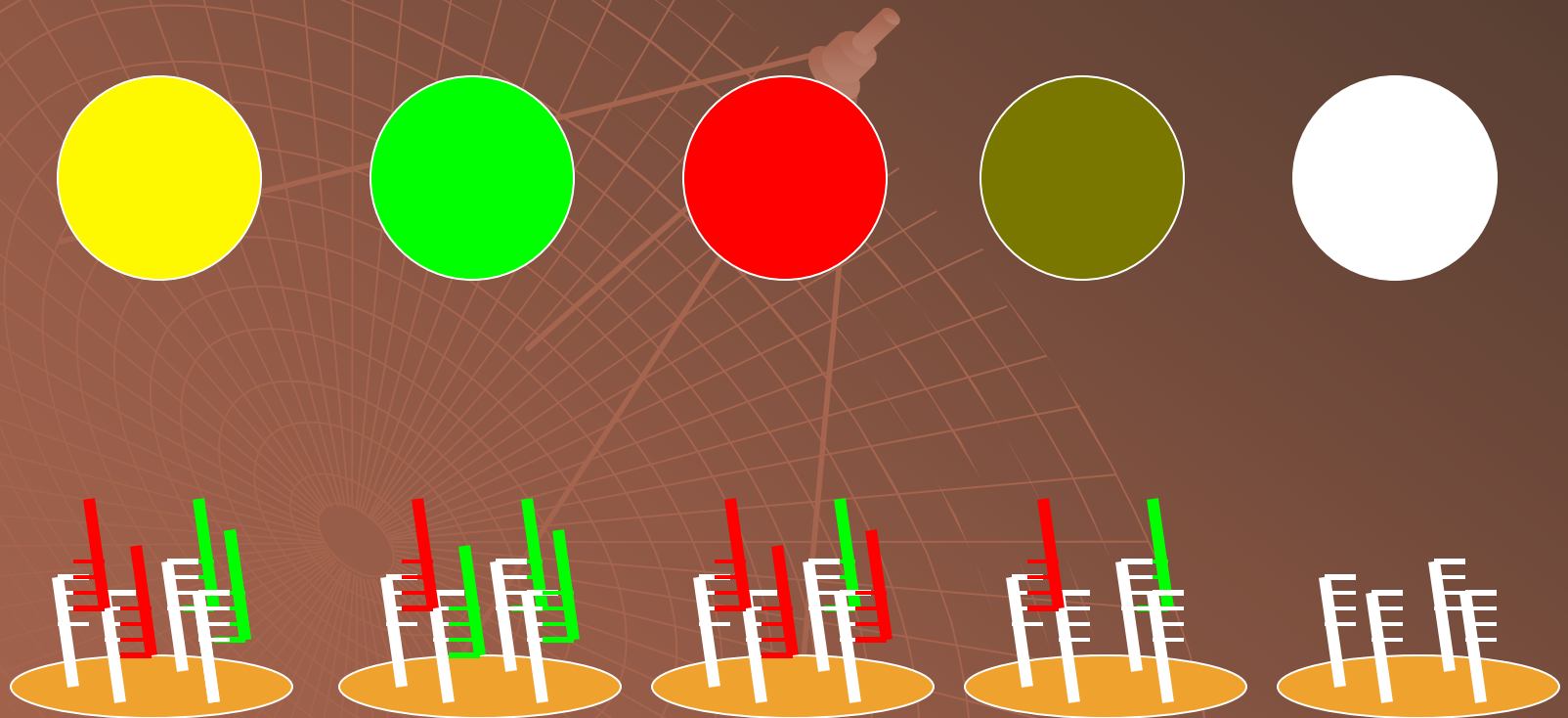




# DNA chipy



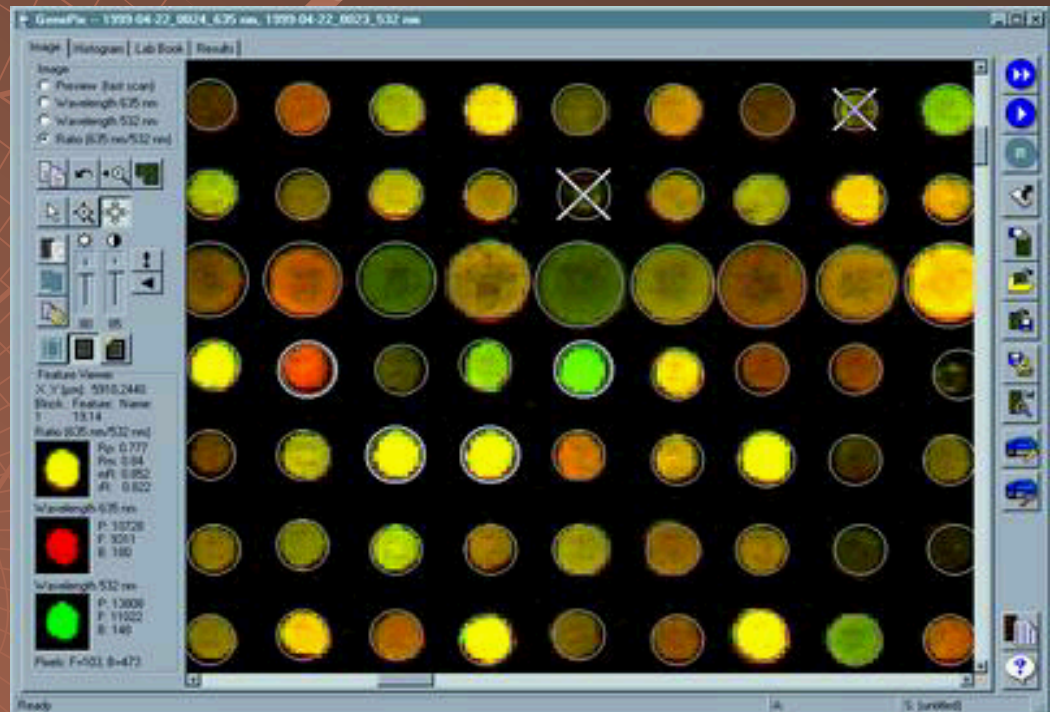
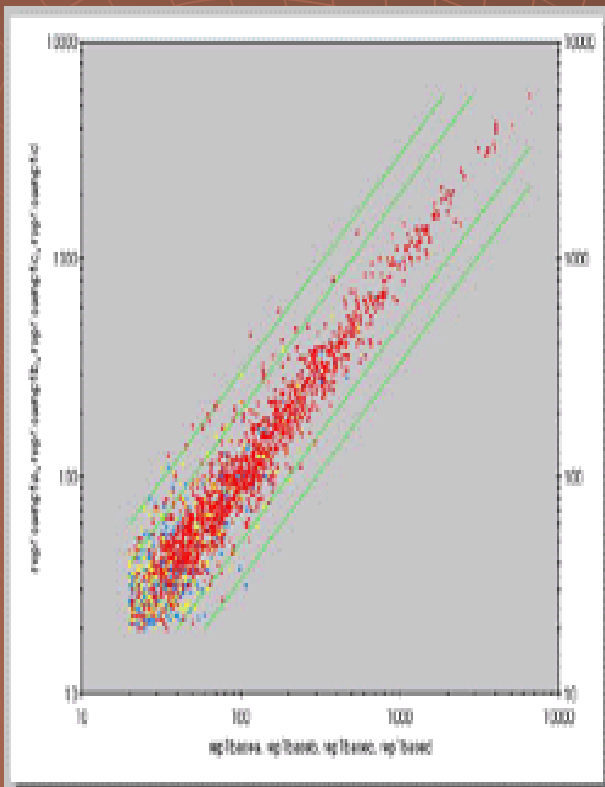
# DNA chipy - barva skvrn



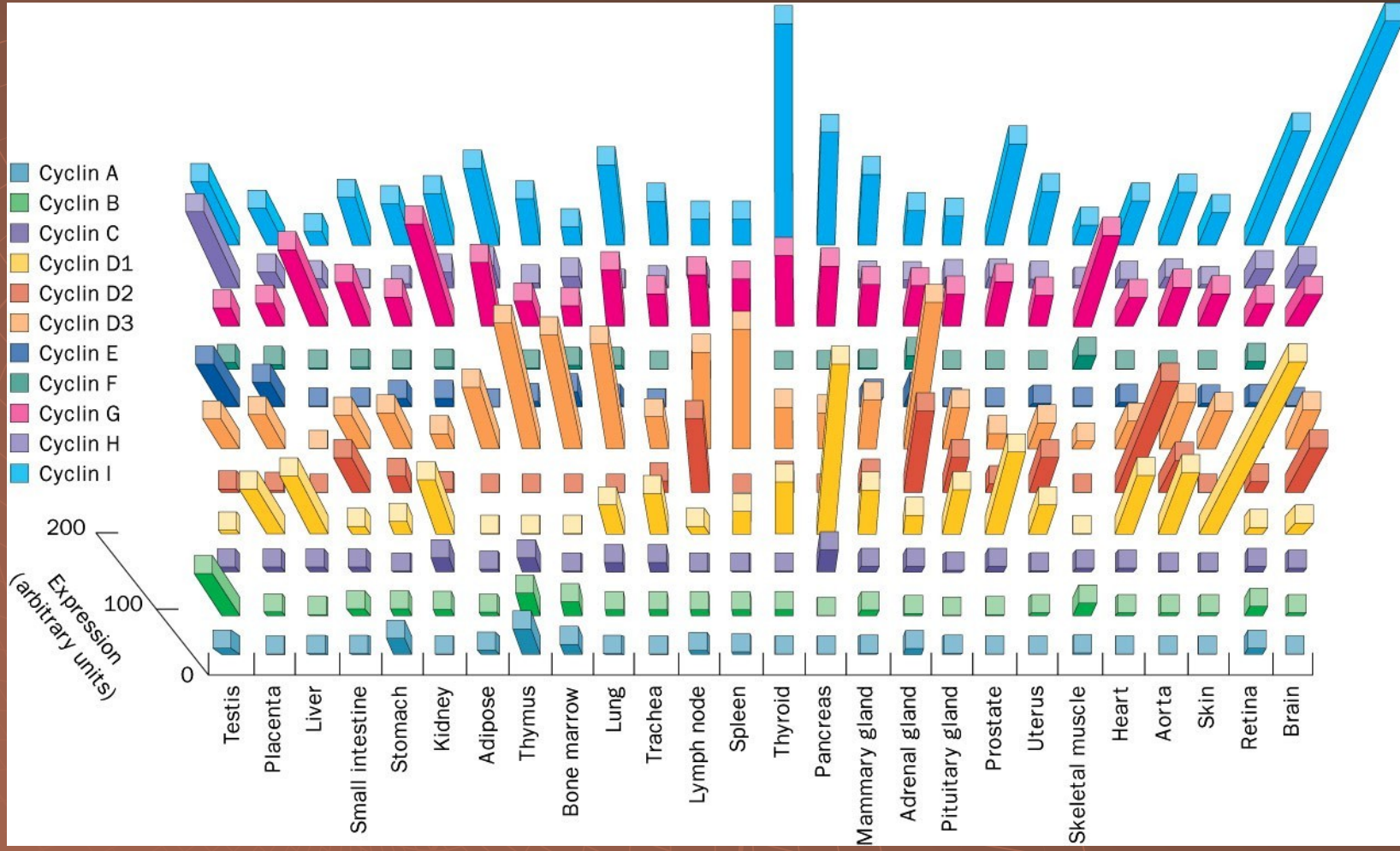
# DNA chipy - vybavení



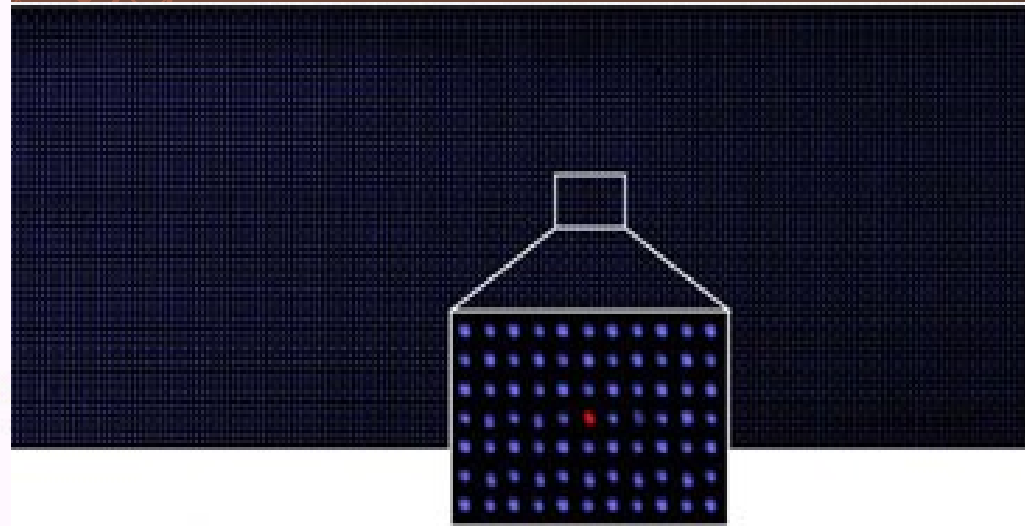
# DNA chip software







# Proteinové chipy



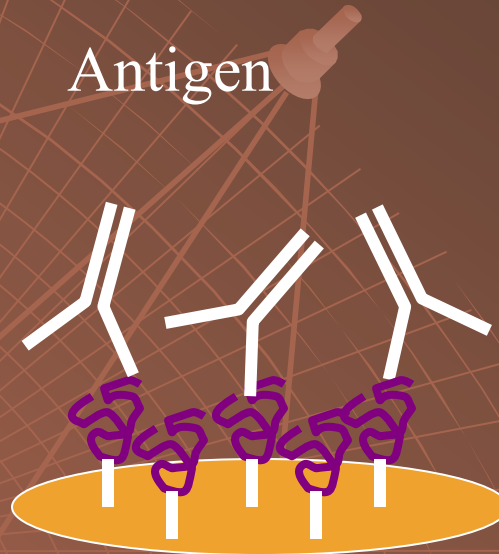


# Proteinové chipy – typy interakcí

- Protilátka



Antigen

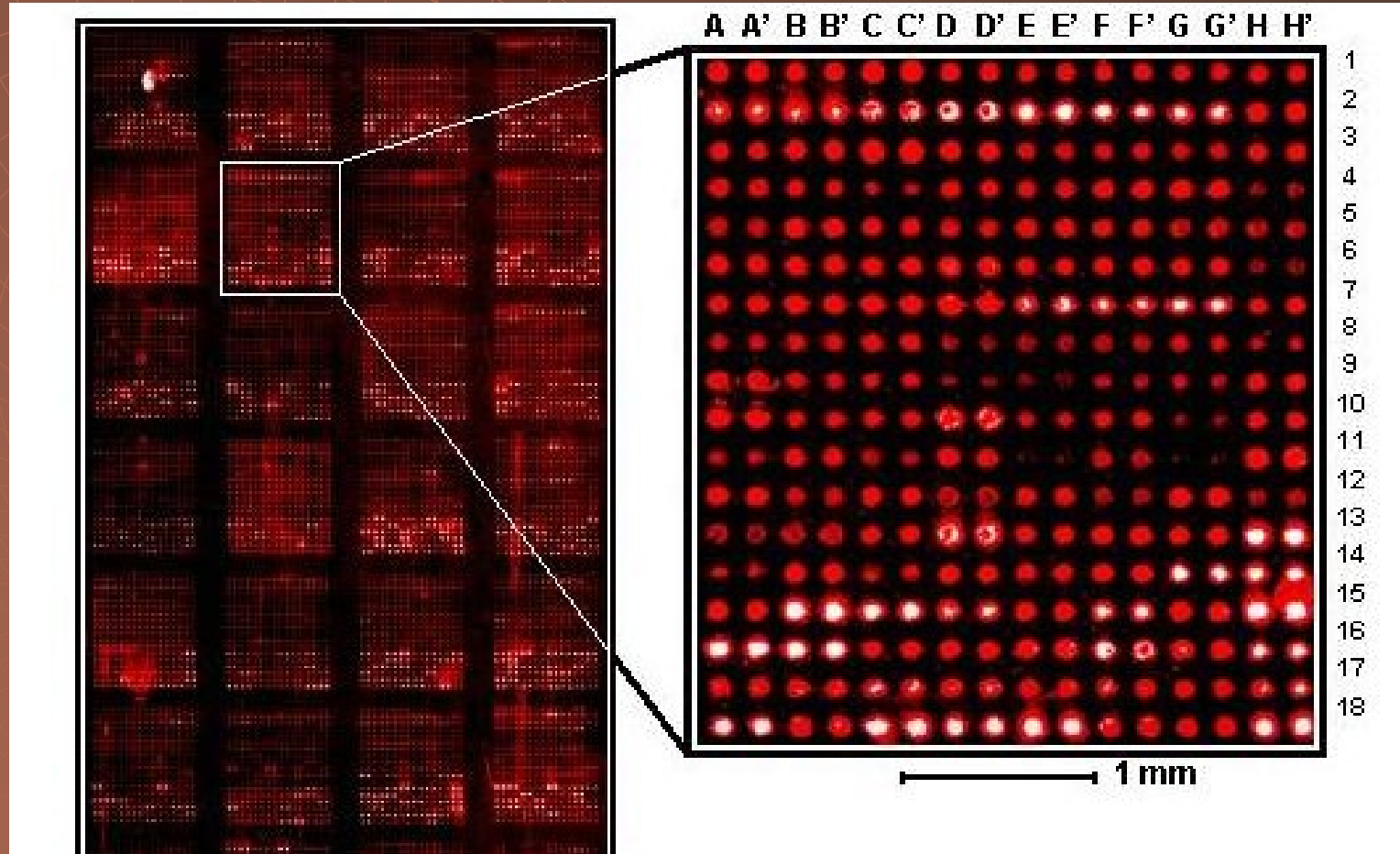


Ligand



• Detekce: SELDI MS, fluorescence, SPR, electrochemická, radioaktivita,

# Anti-GST Probe



# Blotting

- ◆ Southern – DNA
- ◆ Northern – RNA
- ◆ Western - bílkoviny

# Izolace nukleových kyselin

Důraz kladen na čistotu  
nikoliv množství - PCR

# Cíl izolace

- ◆ Odstranění proteinů
- ◆ DNA vs RNA
- ◆ izolace specifického typu NK



# Typy NK

- ◆ genomická (chromosomální)
- ◆ organelová (mitochondrie, chloroplasty)
- ◆ plasmidy (extra-chromosomální)
- ◆ virová (ds nebo ss)
- ◆ komplementární (mRNA)



# Nejpoužívanější metody

- ◆ na základě rozdílné rozpustnosti – extrakce, srážení
- ◆ na základě vlastností - chromatografie – polarita- adsorpční, náboj-ionexová
- ◆ sedimentace - gradientová ultracentrifugace

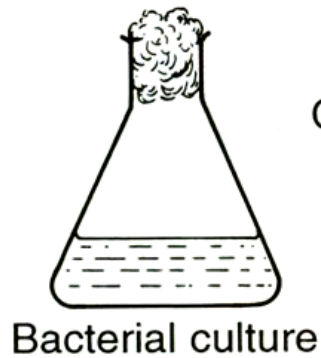
# Postup

1. Rozbití buněk a membrán pro uvolnění NK
2. Inaktivace DNA- nebo RNA-degradujících enzymů (DNasy, RNasy).
3. Separace NK od dalších komponent uvolněných z buňky.
  - Extrakce/Precipitace
  - Chromatografie
  - Ultracentrifugace

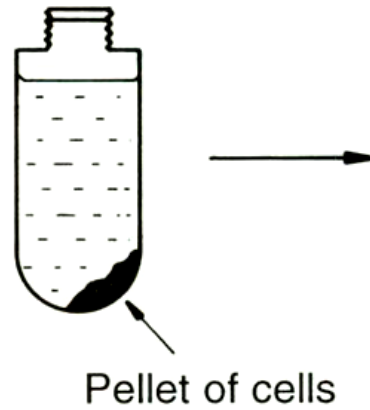


# Extrakce/Precipitace

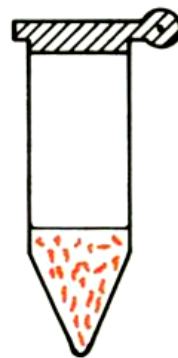
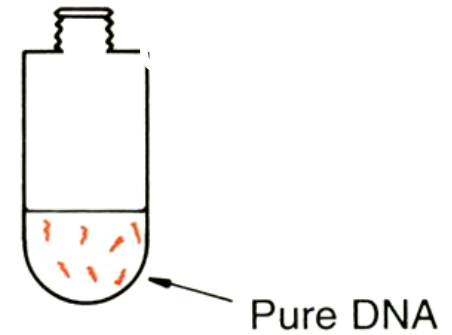
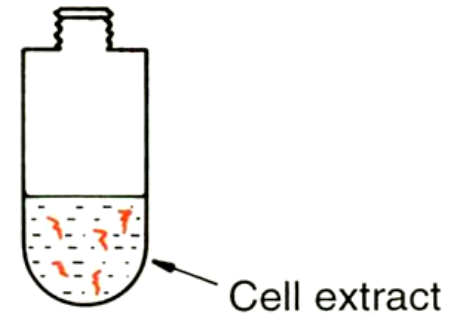
**1 A culture of bacteria is grown and then harvested**



Centrifugation



**2 The cells are removed and broken to give a cell extract**



**4 The DNA is concentrated**

**3 The DNA is purified from the cell extract**

# Izolace genomické DNA

## Typická procedura

1. *Sklizení buněk*

2. *Lyse buněk*

0.5% SDS + proteinase K (55°  
několik hodin)

3. *Fenolová extrakce*

Jemné třepání několik hodin

4. *Ethanolová precipitace*

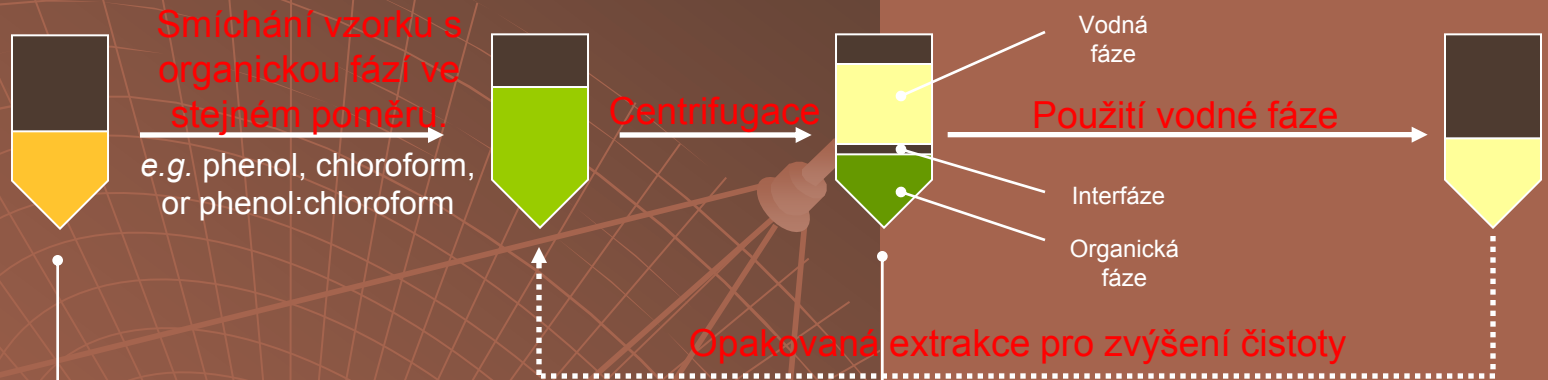
5. *Působení RNAsy a proteinasy K*

6. *Opakování kroku 3 a 4.*



# Extrakce/Precipitace

## Krok 3: Organická extrakce



Hrubý lyzát obsahující NK a další součásti buňky

Vodná fáze obsahuje NK, organická fáze bílkoviny a lipidy. Nerozpustné složky přítomné v **interfázi**.



# Extrakce/Precipitace

## Krok 4: Precipitace NK



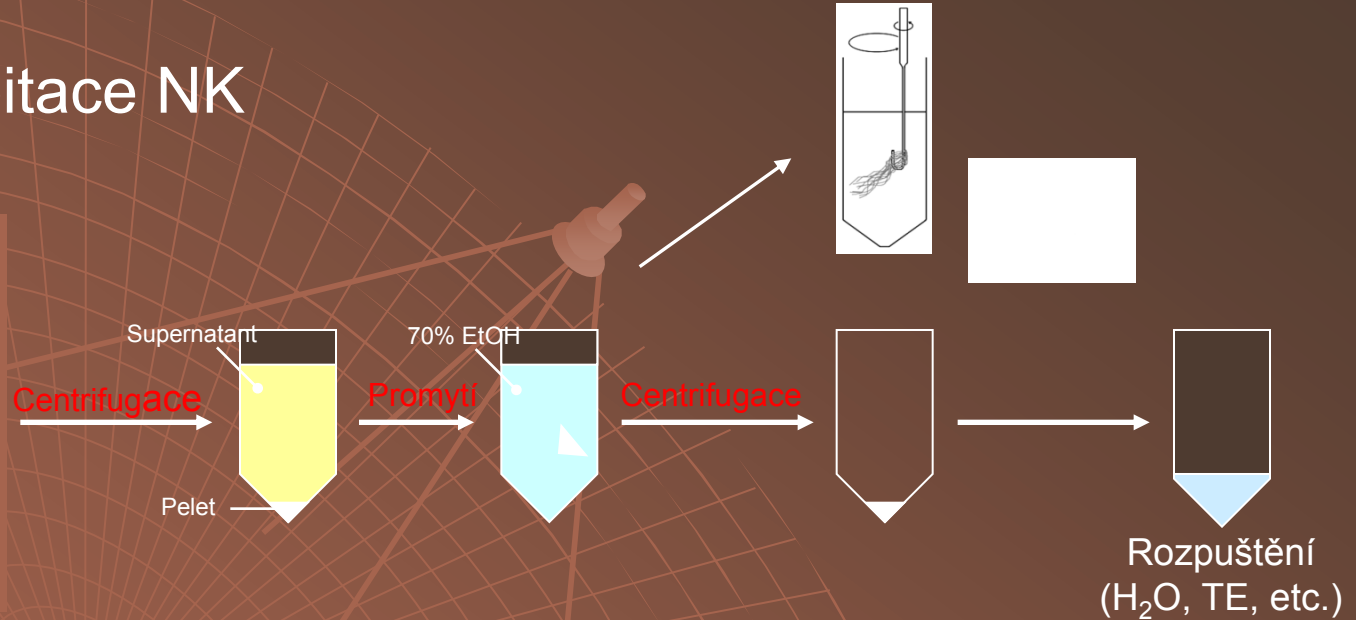
Přidání EtOH a soli

2-2,5 objem EtOH

-20° C

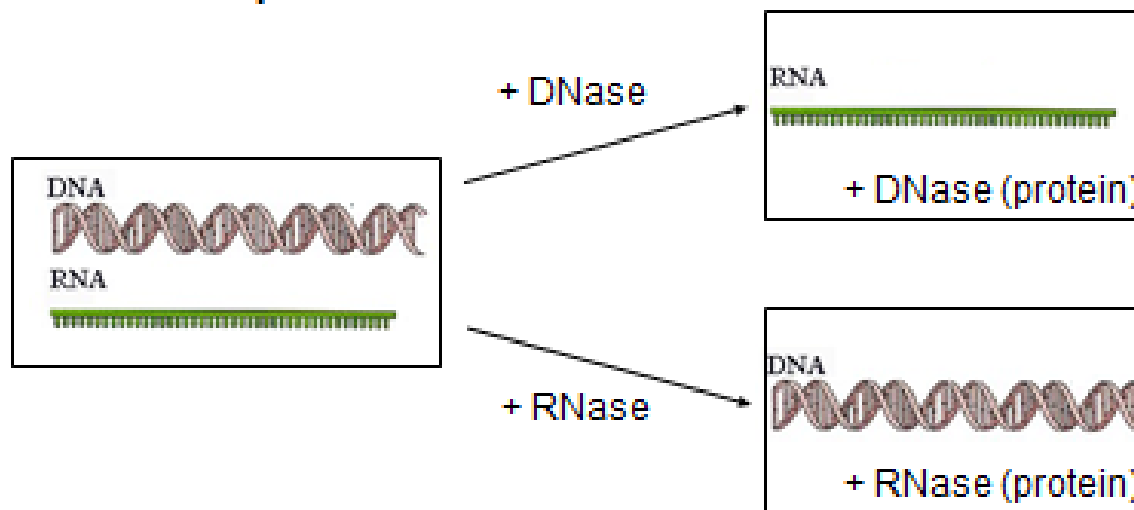
Vysoká I

pH 5-5.5



## Detail kroku 5

Použití nukleas pro odstranění nechtěné DNA nebo RNA



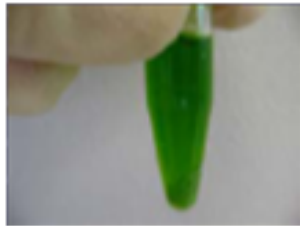
The background features a faint, light-colored grid pattern on a dark brown background. The grid consists of concentric circles and radial lines, resembling a chromatogram. A red spot is visible on the grid, and a blue line is drawn across it.

# Chromatografie

# Adsorpční chromatografie

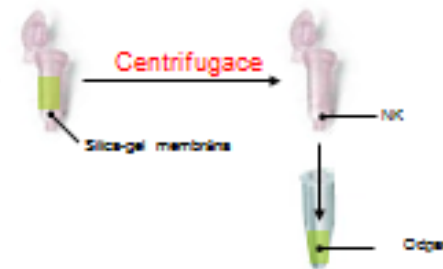
## Adsorpční chromatografie

Krok 1: Příprava lyzátu



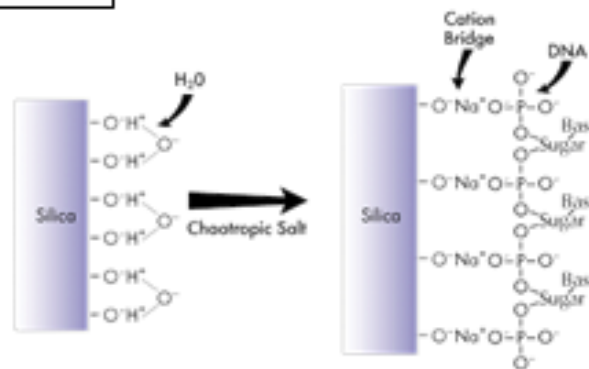
Aplikace na  
kolonku

Krok 2: Adsorpce na silikagel



Extrakční pufr pro vazbu DNA a  
RNA na silikagel:

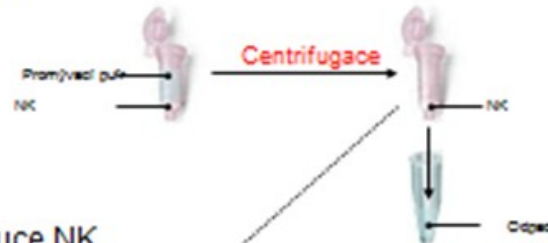
- nízké pH
- vysoká iontová síla
- chaotropní soli



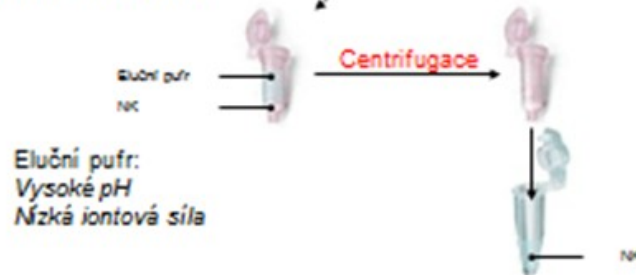
# Adsorpční chromatografie

## Adsorpční chromatografie

Krok 3: Vymytí kontaminant



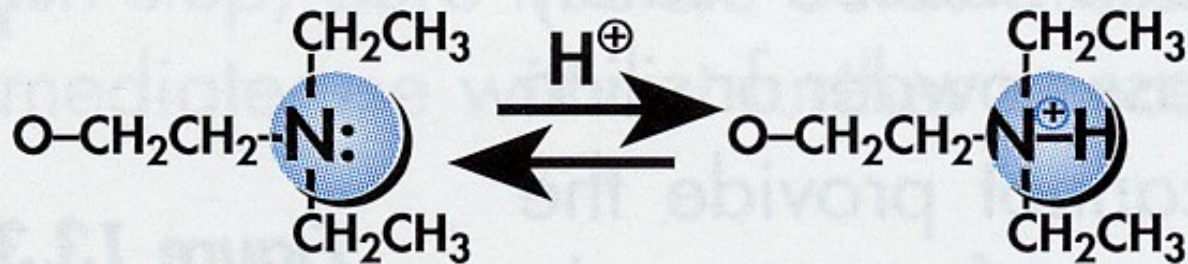
Krok 4: Eluce NK





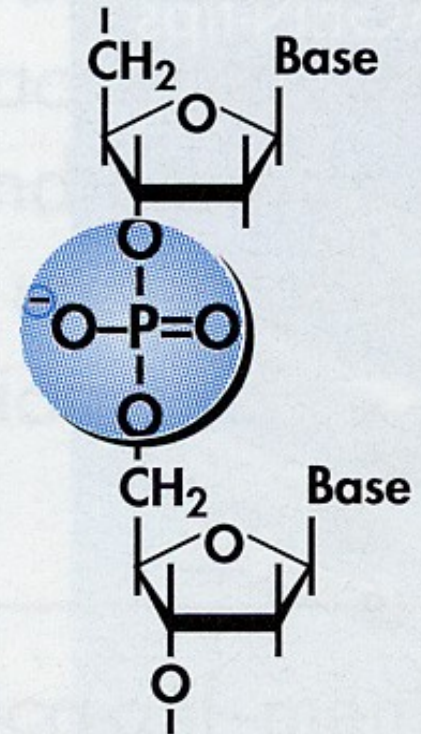
# Ionexová chromatografie

Vazba při nízkém pH nízké I



Eluce zvýšením pH nebo vysokou I

DEAE (diethylaminoethanol)



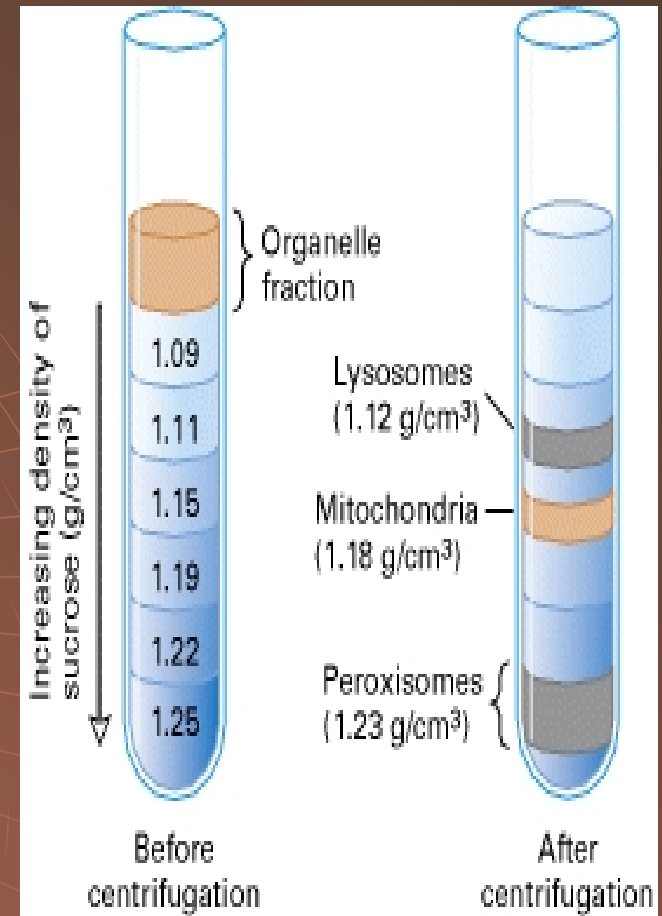
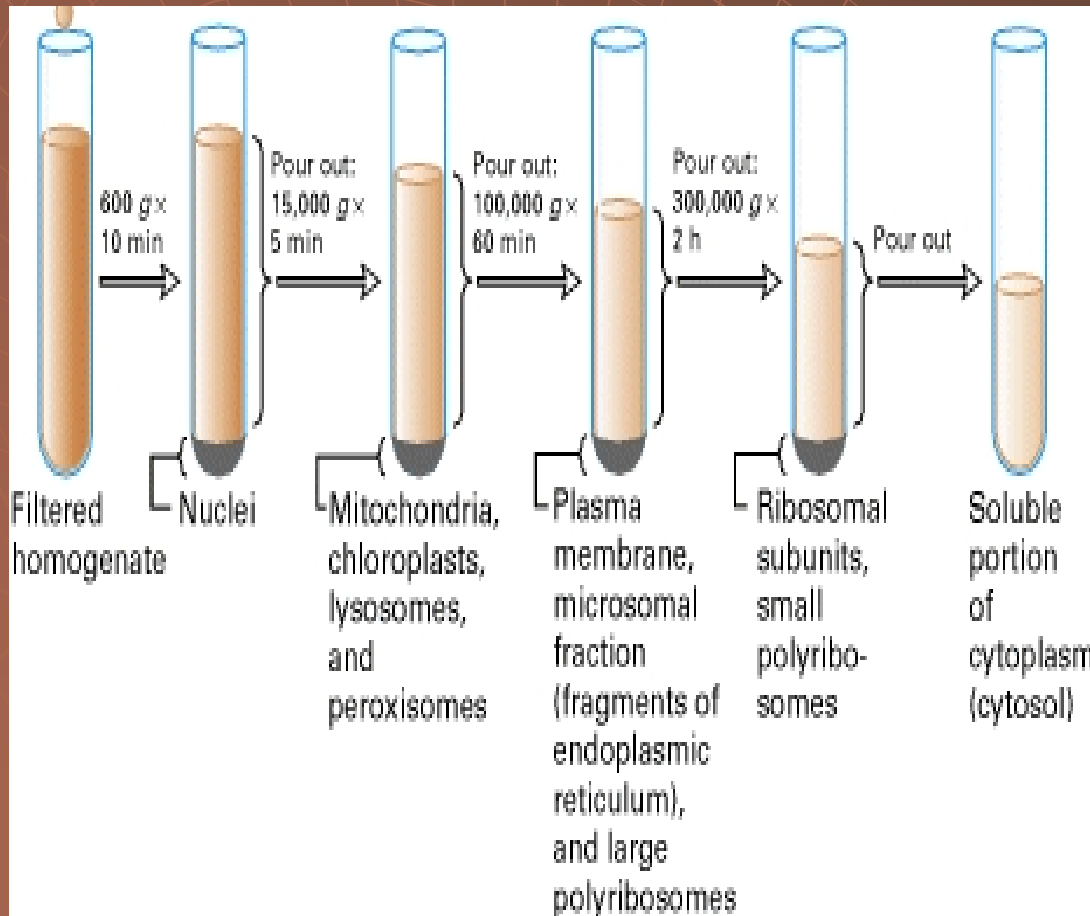
Chemical structure  
of DNA



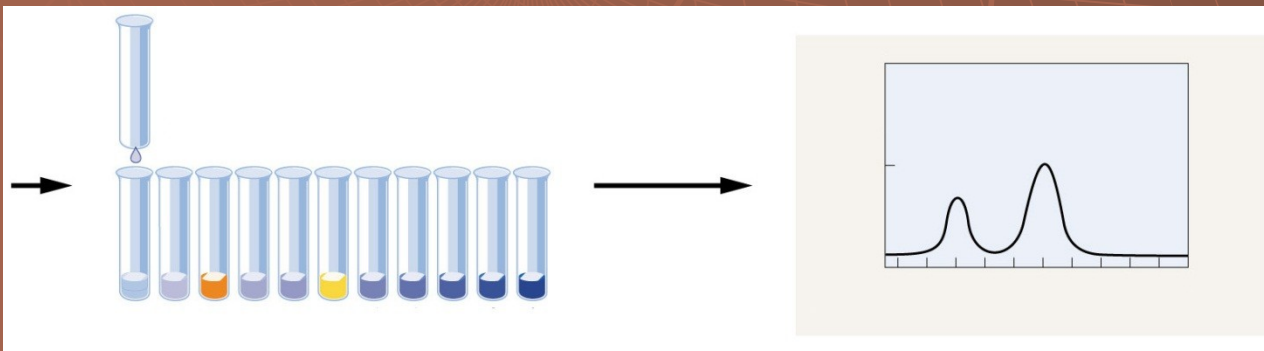
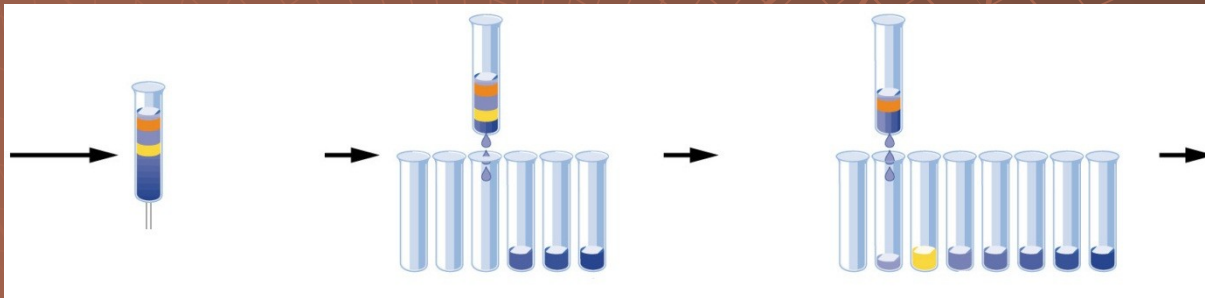
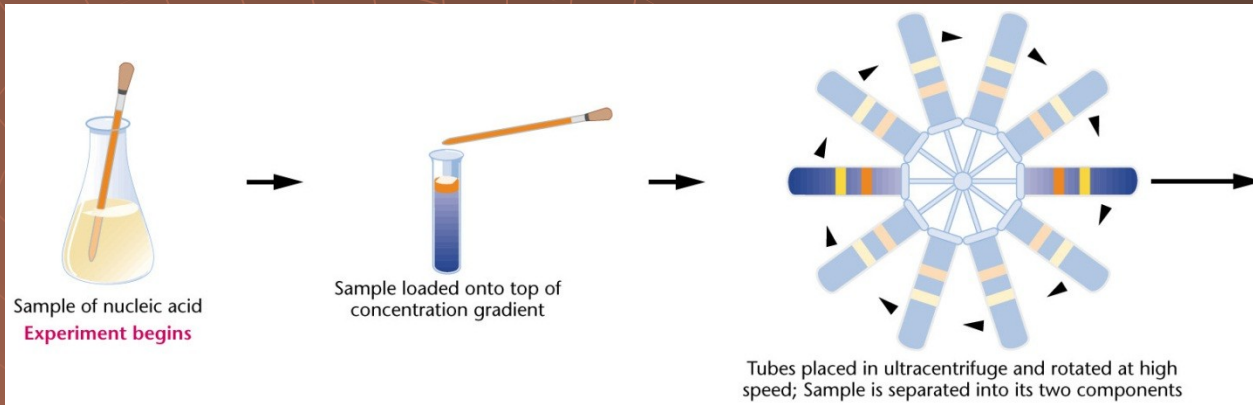
The background features a stylized, semi-transparent illustration of a centrifuge rotor. It consists of a central hub with multiple radial arms extending outwards. A grid of concentric circles and radial lines is overlaid on the rotor, representing the path of particles during centrifugation. A small, light-colored sample tube is positioned at the end of one of the arms. The entire graphic is rendered in a light, muted brown color against a darker brown background.

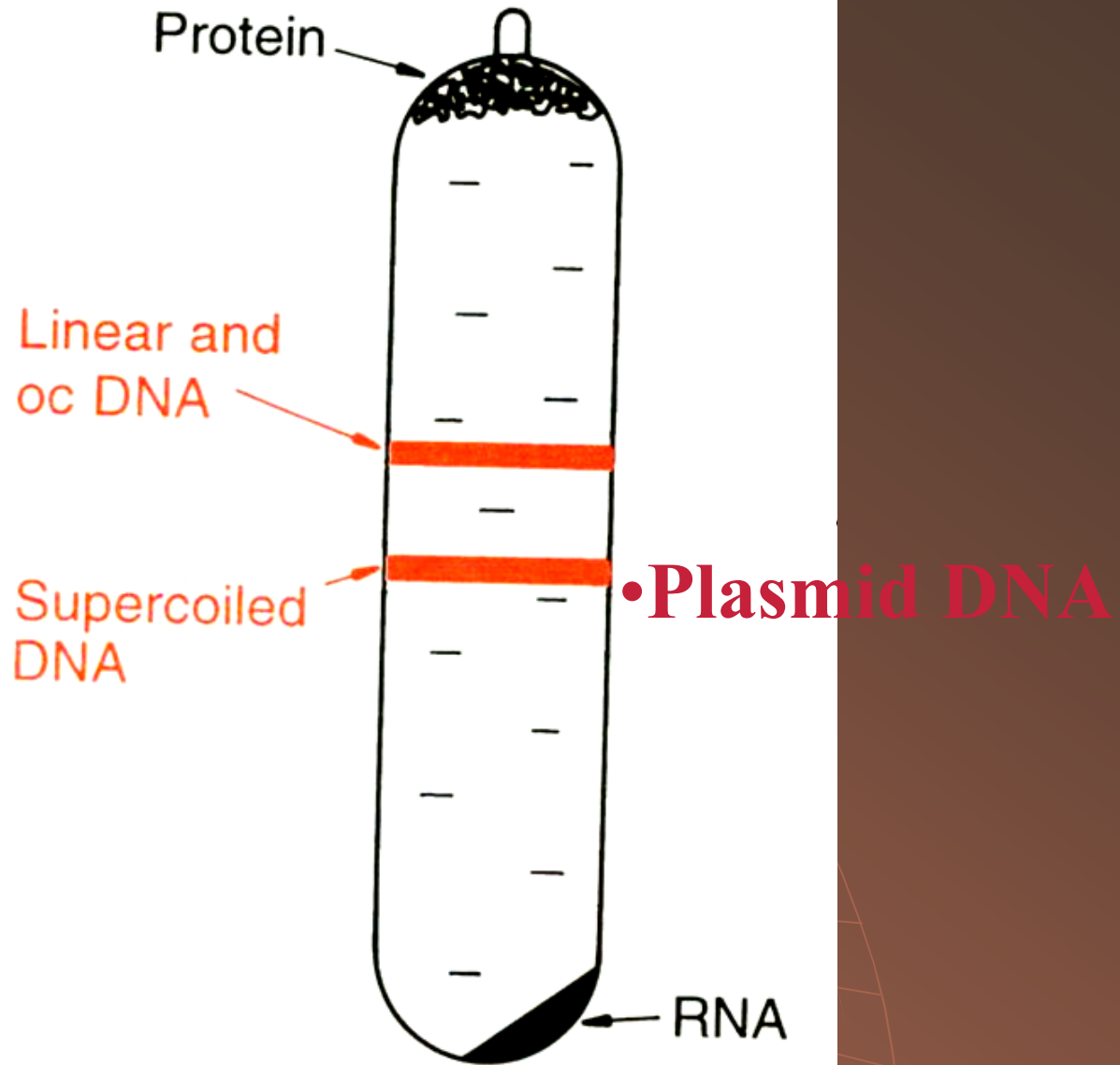
# Gradientová centrifugace

# Diferenciální versus gradientová centrifugace



# Gradientová centrifugace DNA CsCl





(a) An EtBr-CsCl density gradient

# Izolace RNA - speciální přístupy

nutno použít inhibitory RNAsy

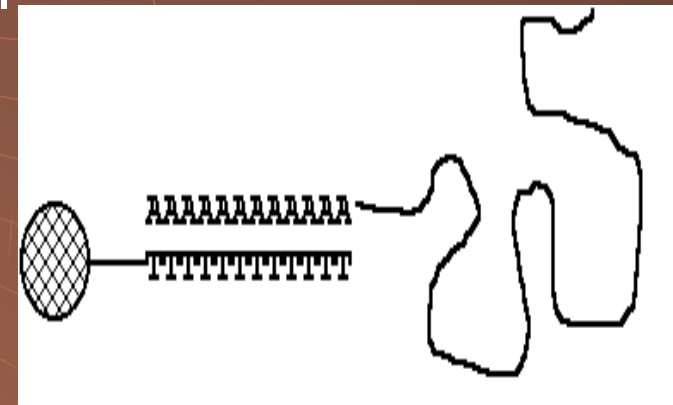
extrakce guanidinium chloridem

fenolová extrakce při  $\text{pH} < 4$  ( $\text{pH} 8$  pro DNA)

působení RNase-free DNase

selektivní precipitace rRNA, mRNA s LiCl

oligo-dT afinitní chromatografie - mRNA

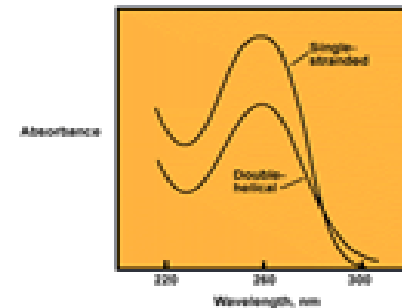




# Kontrola čistoty a kvantifikace NK

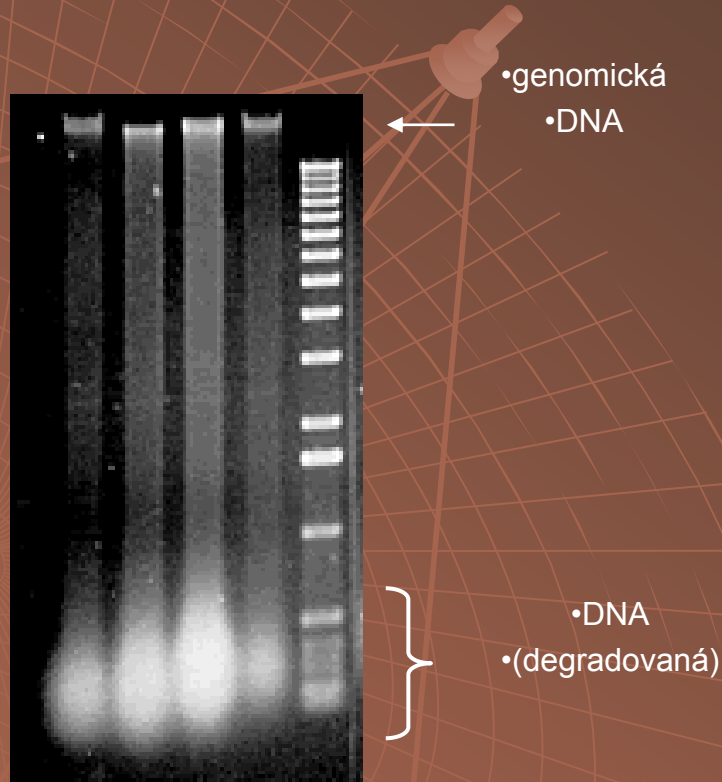
## Kontrola NK

- spektrofotometricky
  - kvalita
  - kvantita
- gelová elektroforéza
  - kvalita



DNA	$A_{260}$	$1.0 \approx 50 \mu\text{g/ml}_{ds} \approx 33 \mu\text{g/ml}_{ss}$
	$A_{260}/A_{280}$	1.6 - 1.8
RNA	$A_{260}$	$1.0 \approx 40 \mu\text{g/ml}$
	$A_{260}/A_{280}$	$\sim 2.0$

# Kontrola degradace: DNA



# Kontrola degradace: RNA

