



Metodologie molekulární fylogeneze a taxonomie hmyzu

Bi7770

Andrea Tóthová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Metody

Molekulární znaky mají oproti klasickým řadu výhod:

Je jich libovolné množství

Jsou vzájemně distinktní, kvalitativní

Umožňují srovnávat i nepříbuzné organizmy

Jsou selekčně neutrální

Kde se molekulární biologie využívá?

**Recentně aplikované technologie –
genetické inženýrství, DNA finger-printing v
sociální a forenzní sféře, pre a postnatální
diagnostika dědičných nemocí, genová
terapie, „ drug Design“ ...**

**Detekce infekčních nemocí, monitoring
populací, záchrana ohrožených druhů,
příbuzenské vztahy...**

Základné metody

- Štěpení NK
- Polymerase chain reaction
- Proby, Hybridizace
- Vektory, Molekulární klonování
- NK enzymy
- Microarray
- DNA sequencing
- Elektroforetická separace NK
- Detekce genů:
 - ***DNA:** Southern blotting; inSitu hybridization; FISH
Technique
 - ***RNA:** Northern blotting
 - ***Protein:** Western blotting, immunohistochemistry

K purifikaci (extrakci) nukleových kyselin může být jako vstupní materiál použit:

- krev
- tkáň
- bakterie
- houby
- živočišné buňky
- rostliné buňky
- exkrementy, vývržky
- agarózové gely



Výběr použité techniky závisí pouze na nás...

- typ vstupného materiálu
- očekávaný výtěžek
- věk vzorků
- čas
- finance
- požadovaná kvalita

Všeobecný postup extrakce:

1. Digesce tkáně / lyze buněk
2. „chelátování“ a proteinázová fáze
3. Separace NK a proteinů
4. Pročištění

Digeste tkání/ lyze buněk

- narušit buňky nebo tkáně
- vyhnout se metodám, které narušují DNA
- zvolená metoda závisí na typu buněk

Příklady metod:

- enzyme-based lyzozýmy
- ultrazvuk
- tekutý dusík
- SDS-based narušení membrány

QIAgen DNeasy DNA Kit

1. Použití Proteinase K
 - rozkládá proteiny a inhibuje nukleázy
2. Lyze: QIAgen Buffer AL (guanidium-HCl)
 - hypertonický solný roztok
3. Vysrážení DNA s EtOH
4. Spin column - DNA se naváže na silica-membránu
5. Promytí
6. Eluce 1 (and 2), s teplým Bufferem AE (Tris-EDTA)

Je život fair?

- 1983—Kary Mullis, vědec pracující pro Cetus Corporation řídil podél US Route 101 v severní Californii, když ho napadla myšlenka polymerázové řetězové reakce
- 1985— metoda PCR byla představena vědecké komunitě na kongresu

- Cetus odměnil Karyho Mullise \$10,000 bonusem za jeho nápad
- později, počas korporátní reorganizace Cetus prodává patent na PCR farmaceutické firmě Hoffmann-LaRoche za \$300 millionů

Život není fair!

PCR: Amplifikace DNA

- Často je k dispozici jen malé množství DNA
 - kapka krve
 - Vzácný typ buněk
- V současnosti existují dvě metody pro amplifikaci DNA nebo tvorbu kopií
 - Klonování—trvá dlouho, než dostatek klonů dosáhne požadovaného stupně kvality
 - PCR—funguje dokonce i na jediné buňce hned

Co potřebuje PCR?

- Templát (DNA, kterou testujeme)
- Specifické primery pro studovanou oblast, forward a reverz
- Polymeráza
- Nucleotidy (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Magnesium chloride (enzyme cofactor)
- Buffer
- Enhancer
- Vysoce kvalitní DNA-free voda, minerální olej

Všeobecné PCR podmínky

- Magnesium chloride: 0.5-2.5mM
- Buffer: pH 8.3-8.8
- dNTPs: 20-200 μ M
- Primery: 0.1-0.5 μ M
- DNA Polymeráza: 1-2.5 units
- Templátová DNA: $\leq 1 \mu\text{g}$

Kroky PCR

- Denaturation 93 to 95 C 1min
- Annealing 50 to 55 C 45sec
- Elongation 70 to 75 C 1-2min

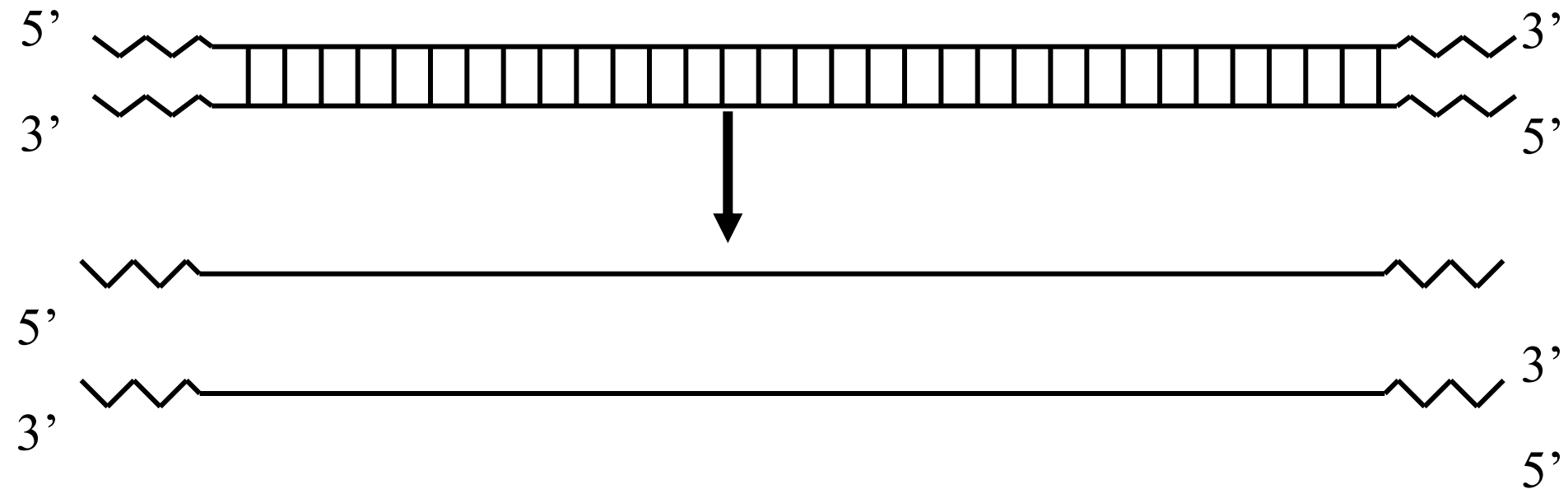
Jak tedy probíhá PCR?

- Horko (94°C) k denaturaci DNA dvouvláken
- Zchlazení (54°C) k přisednutí primerů k templátu
- Teplo (72°C) k aktivaci *Taq* Polymerázy, která prodlužuje primery a replikuje DNA
- Opakování cyklu

Denaturace

Denaturace je první krok, kde se DNA rozpojí vlivem tepla

Vodíkové můstky se přeruší a obě vlákna se oddělí

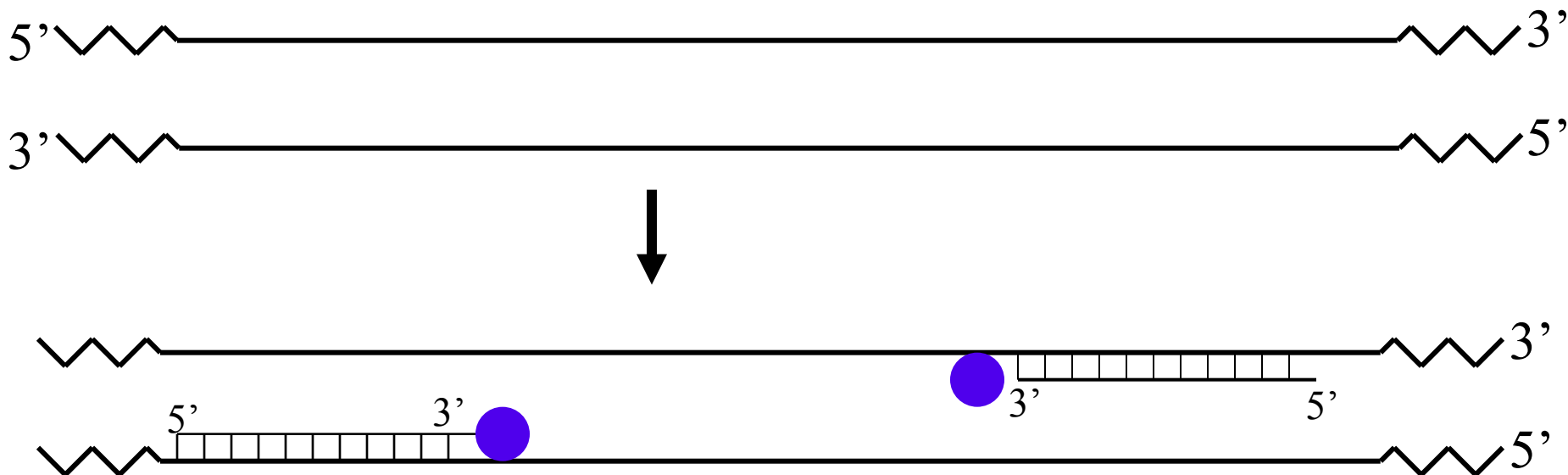


Annealing

Annealing je proces vytváření vodíkových vazeb, kdy nasednou specifické primery na komplementární místo templátu

Probíhá při zchlazení na 55 C.

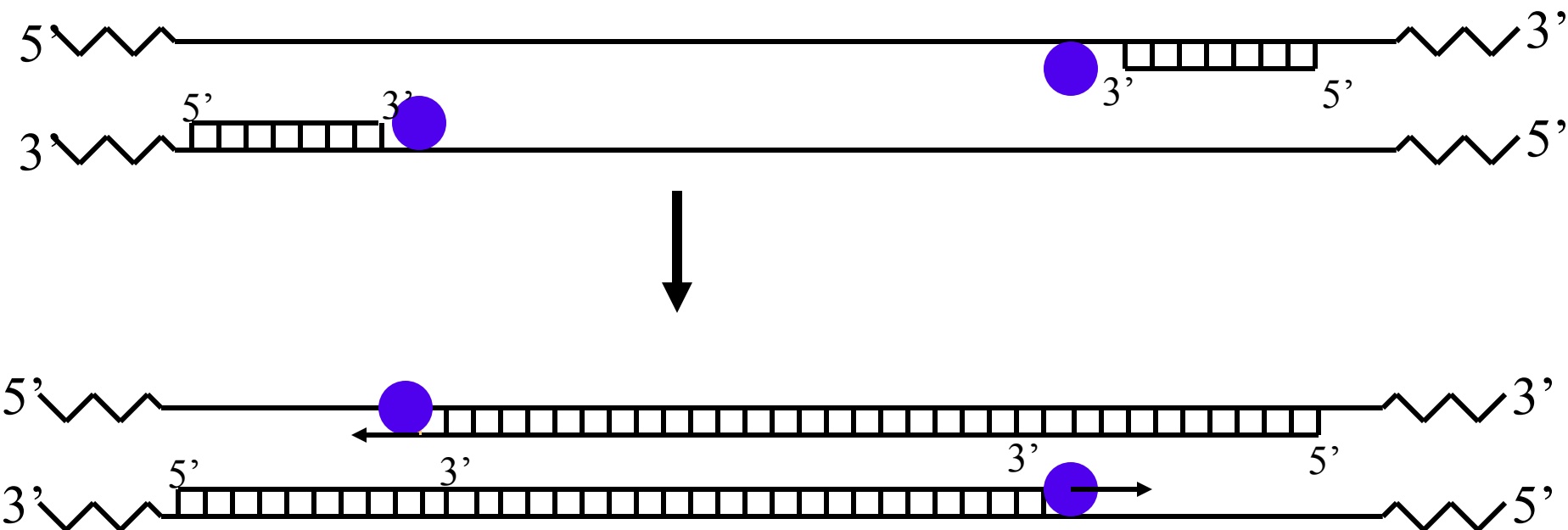
Čas potřebný k tvorbě nového vlákna je ca. 45 sekund



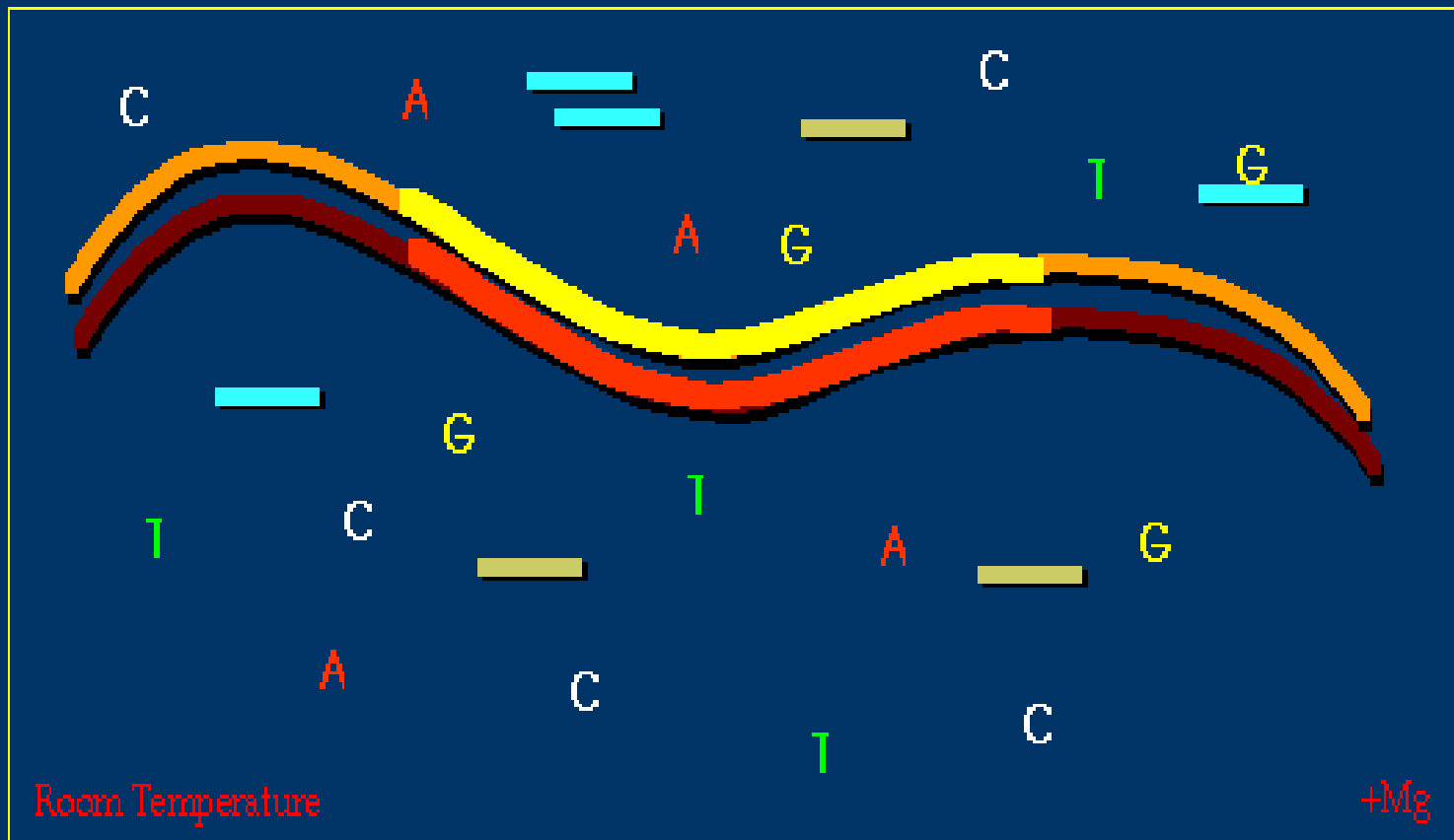
Elongace

Taq polymeráza se váže k templátu a začne připojovat volné nukleotidy komplementární k původnímu řetězci

Probíhá to u 72 C jako optimální teplotě pro TAQ

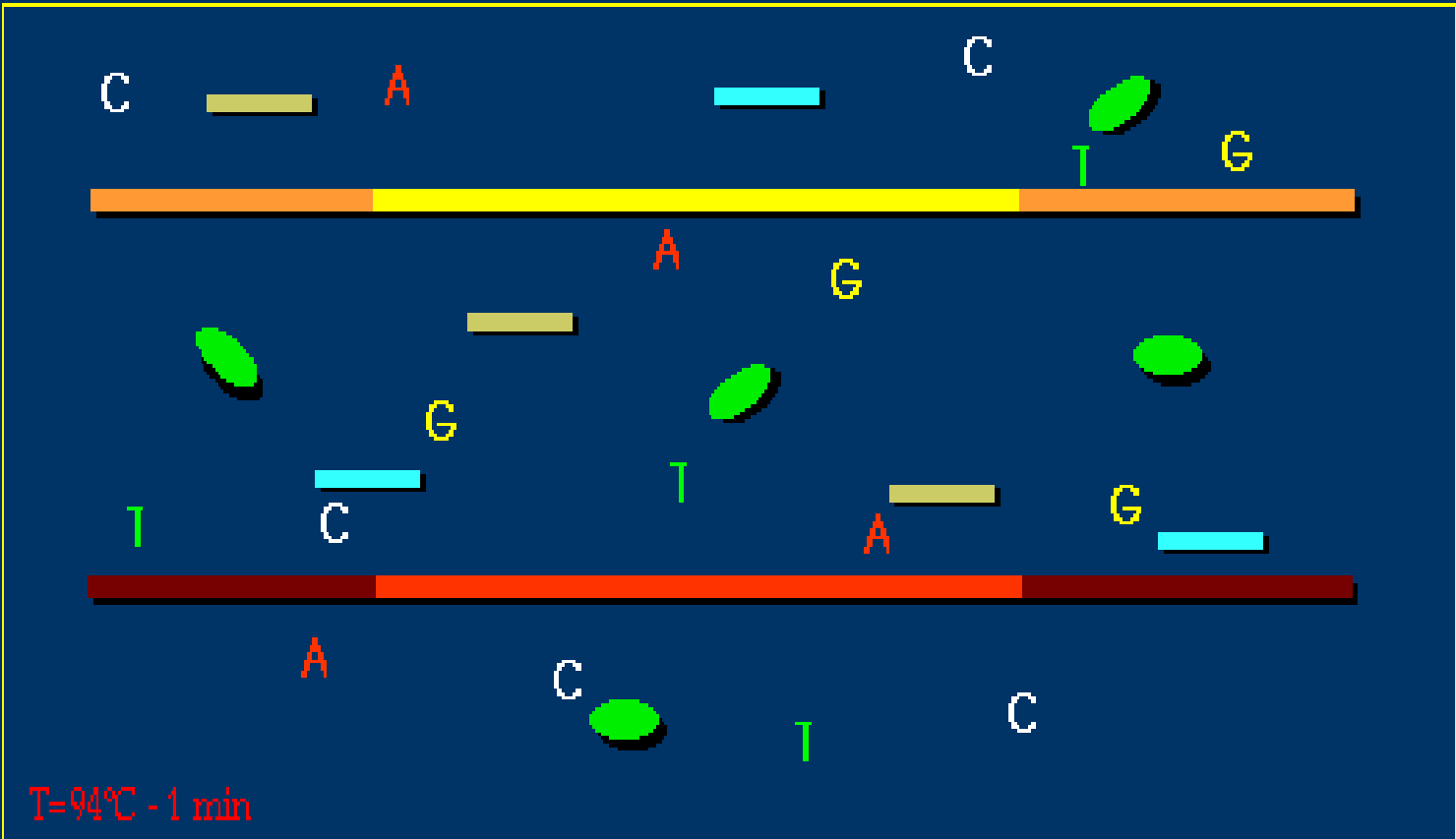


Initial Mix



- Forward Primer
- Reverse Primer
- A G C T Deoxynucleotides

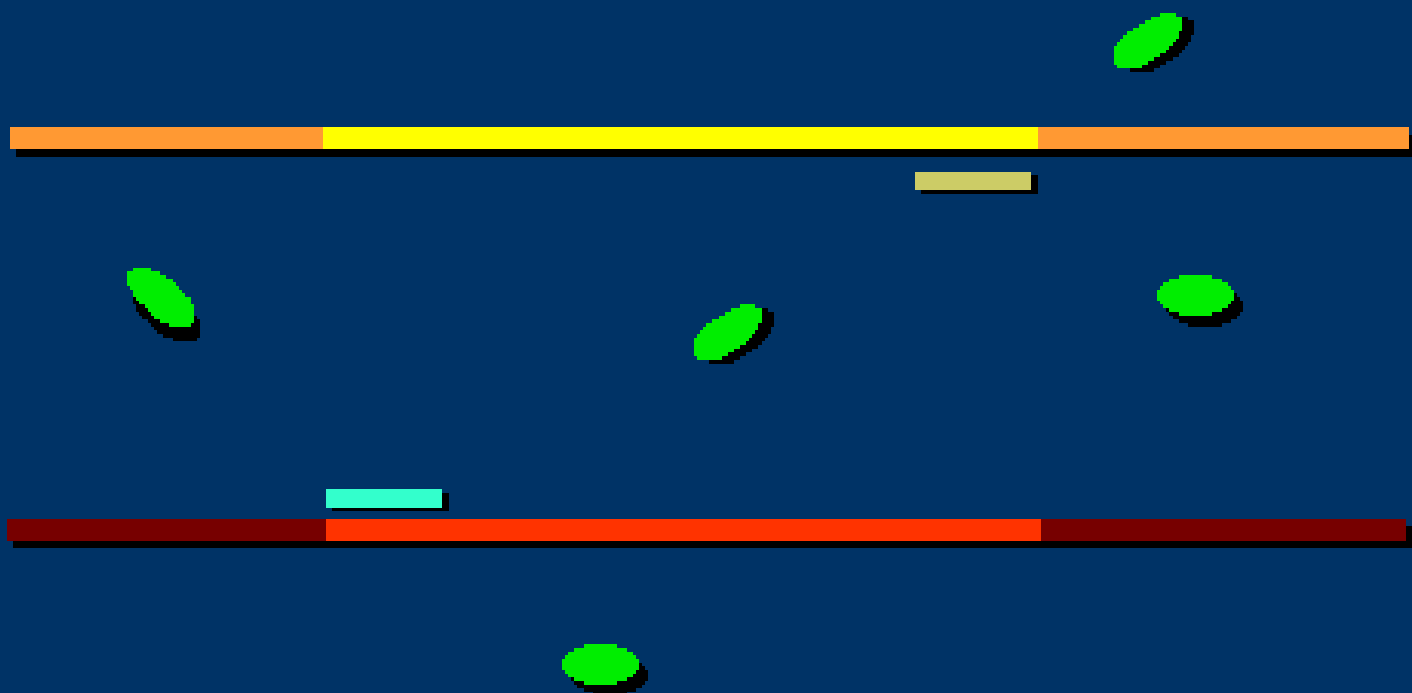
1st cycle - Denaturation Step



T=94°C - 1 min

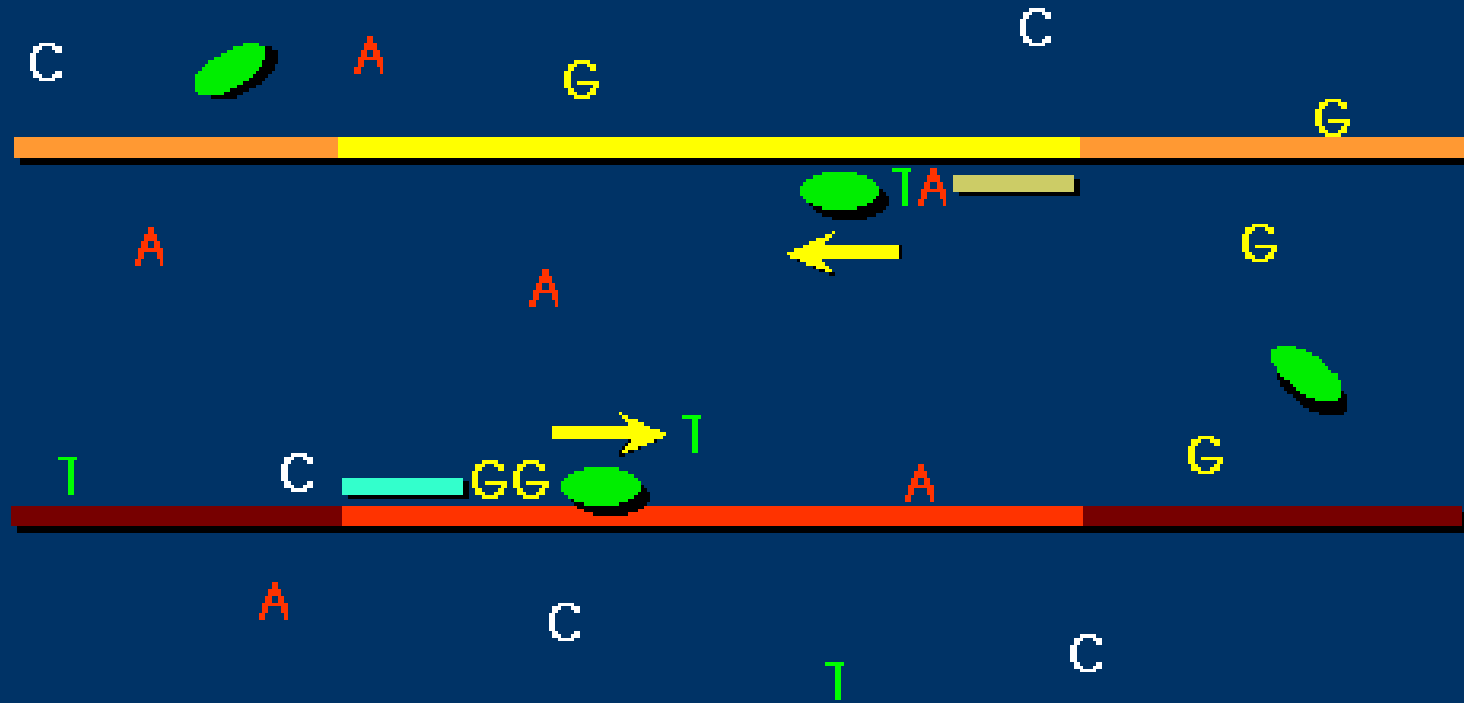
 Taq DNA polymerase

1st cycle - Annealing Step



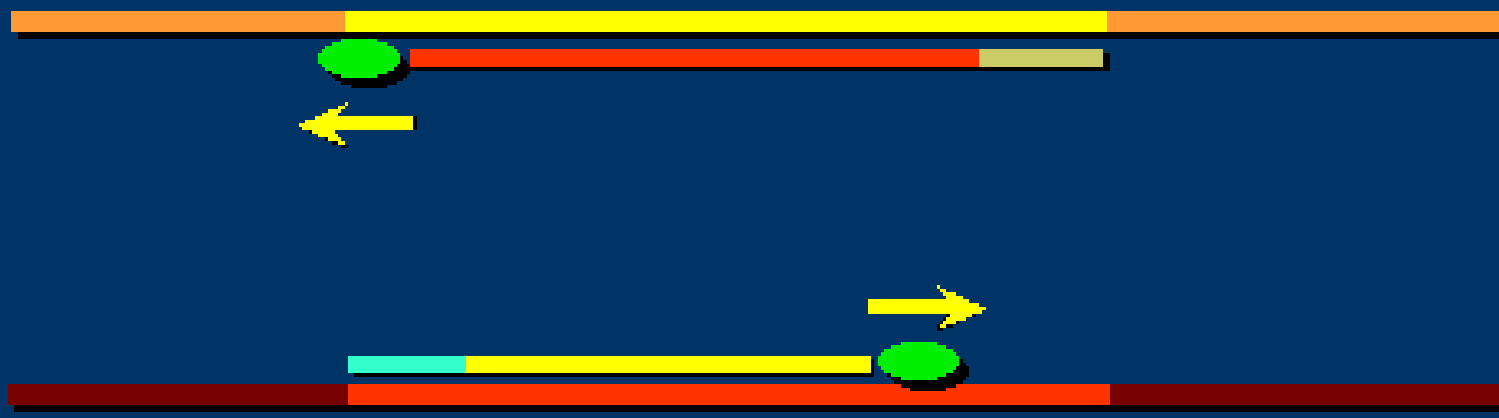
T=55°C - 1 min

1st cycle - Elongation Step



T=72°C - 3 min

1st cycle - Elongation Step

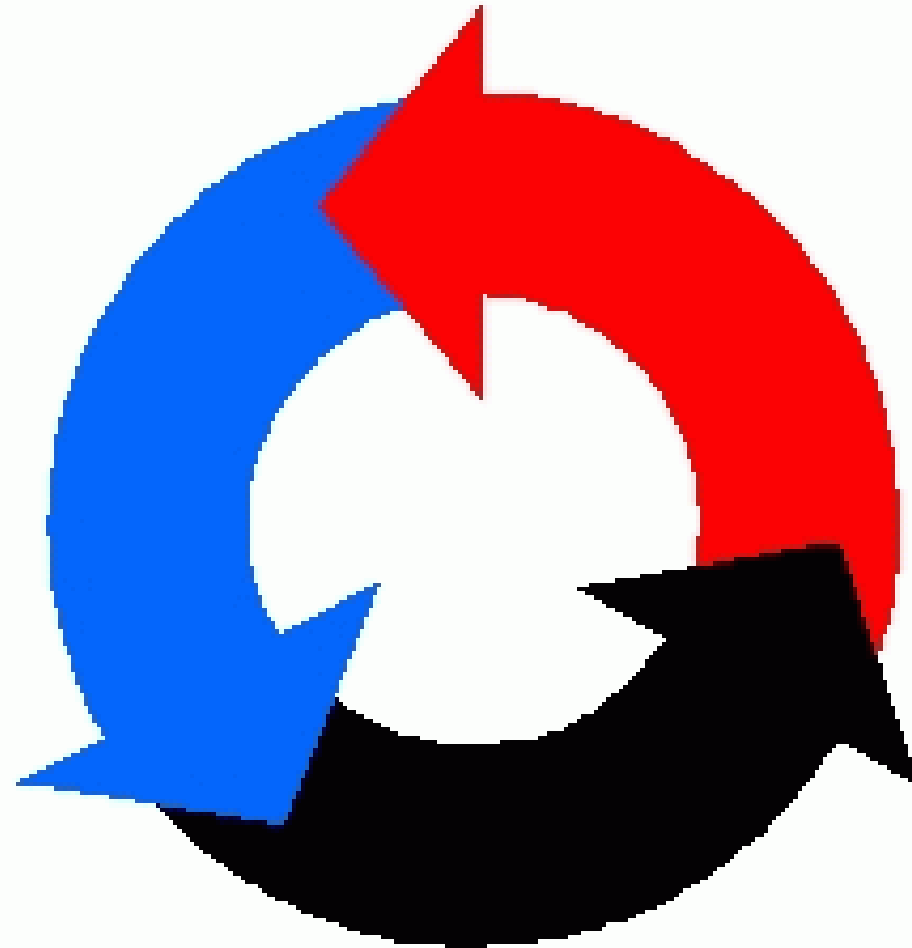


T=72°C - 3 min

PCR Review

- Denaturace: 94 - 95 C
- Primer Annealing: 40 - 65 C
- Elongace DNA: 72
- Počet cyklů: 25-40
- Žádný cílový produkt se netvoří do 3. kroku
- Po 30 cyklech je v roztoku 1,073,741,764 cílových kopií ($\sim 1 \cdot 10^9$).

BIND
55 C



HEAT
94 C

COPY
72 C

PCR Primery

Primer je úsek NK, který slouží jako startovací místo replikace

Je potřeba mít jak forwardní, tak reverzní primer, aby byla cílová sekvence tvořena simultánně v obou směrech

Problémy s primery

- Primery by měly ohraničovat cílovou část DNA sekvenci
- Primery, které jsou komplementární k více místům, budou tvořit víc produktů
- Primer může tvořit dimér se sebou nebo s druhým primerem

5 -ACCGGTAGCCACGAATTCGT-3

|||||||

3 -

TGCTTAAGCACCGATGGCCA-5

Primery, co tvoří hairpiny

- Primery můžou mít komplementární oblasti v rámci sebe , tudíž budou tvořit tzv. hairpin

5 -GTTGACTTGATA

|||| T

3 -GAACTCT

- 3 konec primeru se bude párovat uvnitř primeru a nebude reagovat s templátem

PCR Taq DNA Polymeráza

- Taq je odvozen z *Thermus aquaticus*, organismu nalezeného v 176 F (80 C) horkých pramenech v Yellow Stone National Forest.
- Taq DNA Polymerase (Taq Pol) je stabilní při vysokých teplotách a k činnosti potřebuje správnou koncentraci Mg
- Optimum pro její fungování je 72 C

Nevýhody Taq Pol

- Taq Pol nemá 3' to 5' exonucleázovou aktivitu přítomnou u jiných polymeráz
- Taq špatně zařadí 1 bázi v 10^4 .
- u 400 bp cílové sekvence bude chybovost v 33% molekul po 20 cyklech

Jak předejít problémům?

- Pfu DNA Polymeráza z *Pyrococcus furiosus* má 3' to 5' exonucleázovou aktivitu
- Chybovost je pouze 3.5% po 20 cyklech
- Po přidání většího množství primeru lze předejít dimérům
- Pro neznámé geny lze použít primery příbuzných druhů

Limitace PCR

- Jsou potřebné informace o cílové sekvenci design primerů pro neznámé známé hraničné oblasti

Chybovost při DNA replikaci

Taq Pol – Error 40% po 20 cyklech

- Krátka délka a omezené množství produktu
do 5kb je lehký amplifikovatelný produkt .
do 40kb je amplifikace s modifikacema možná
nelze amplifikovat geny >100kb
nelze použít v projektech sekvenování genomu

Design PCR primerů

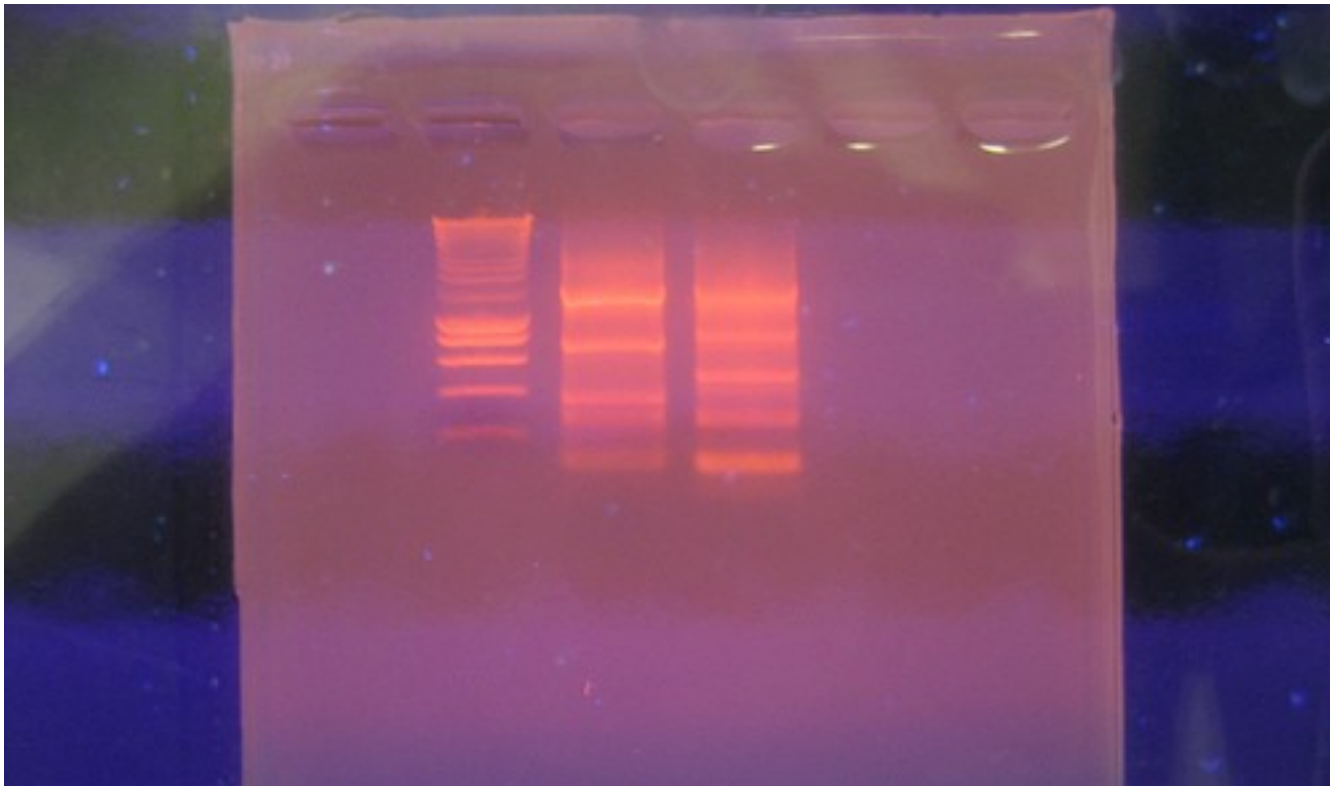
- Sekvence primerů by měly být unikátní
- Sekvence primerů by měly být ~20 bází dlouhé
- Obsah G/C by měl být 45–55%.
- Annealingová teplota by měla být podobná
- Na 3 -konci by měly být G nebo C.
- Nesmí mít self-komplementární oblasti nebo vytvářet hairpiny
- Nesmí mít repetitivní oblasti

Výhody PCR

- Rychlost
- Snadné použití
- Citlivost
- Robustnost

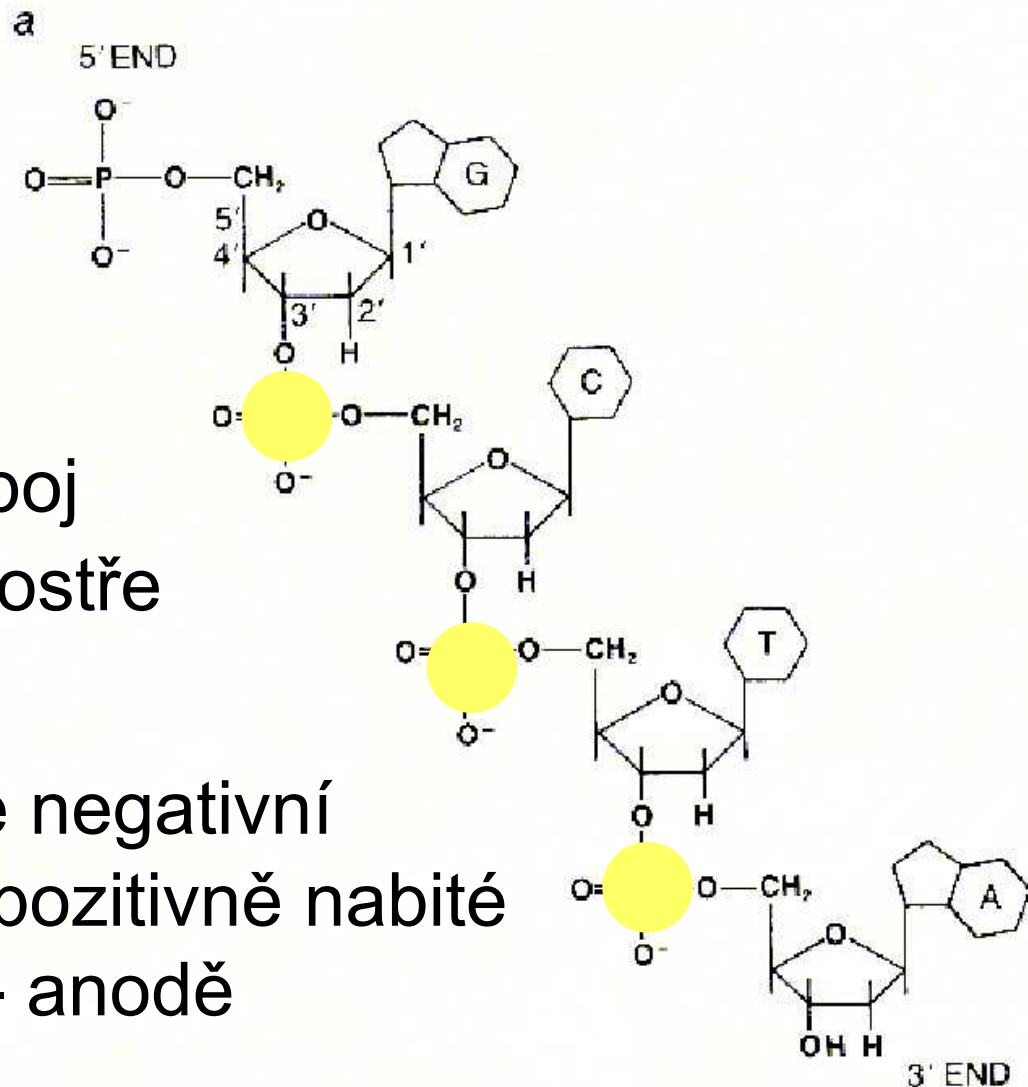
Agarózová gelová elektroforéze

Elektroforeze je způsob separování molekul na základě rychlosti jejich pohybu v gelu v elektrickém poli

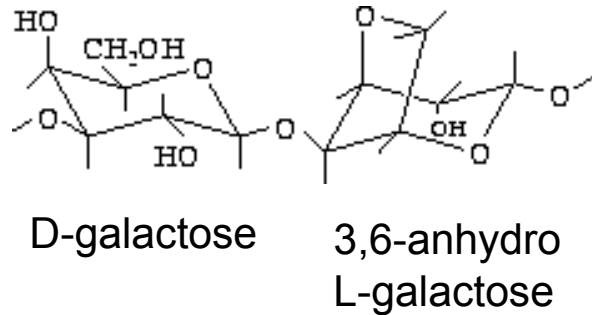


DNA má negativní náboj
díky cukrofosfátové kostře

DNA putuje od černé negativní
elektrody (katody) k pozitivně nabitě
elektrodě (červená) - anodě

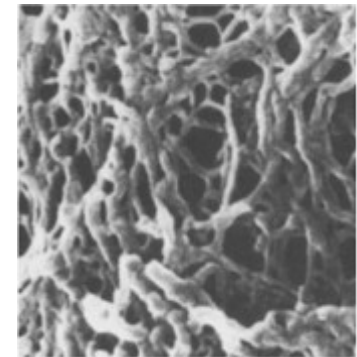


Agaróza



Polymerizací vytvoří pevný gel, který je pórovitý a umožňuje pohyb DNA

Krátke DNA fragmenty prochází gelem rychleji než dlouhé



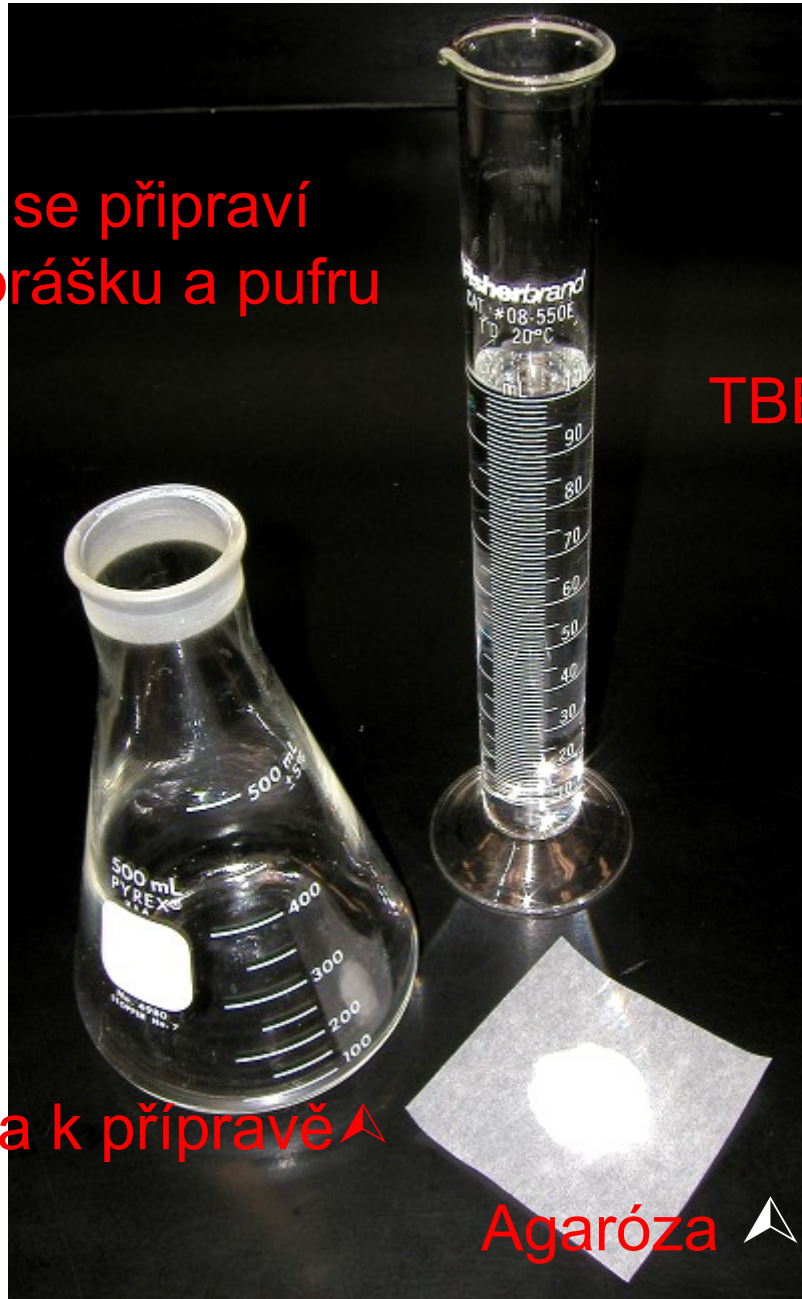
SEM agarózy

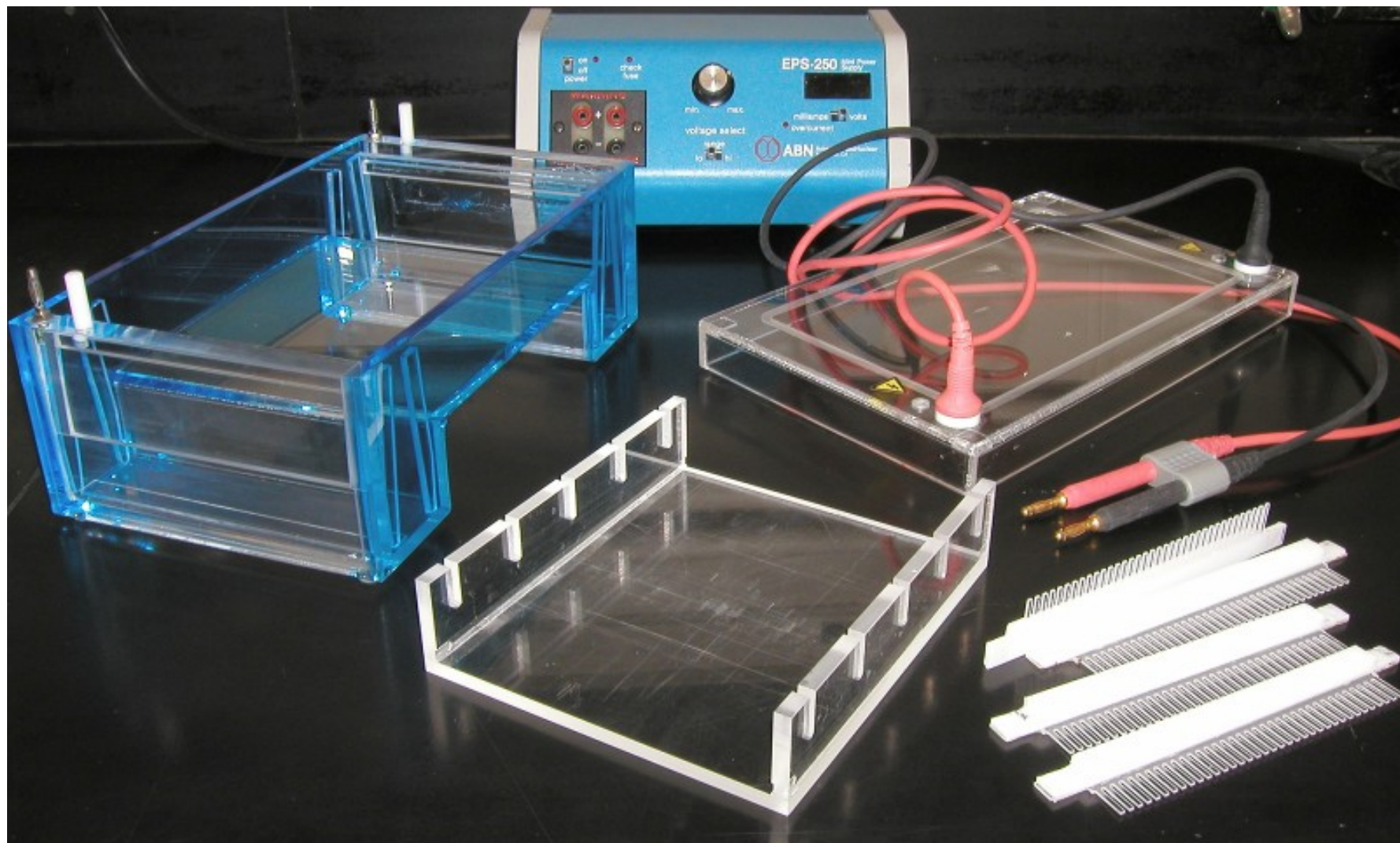
Agarózový gel se připraví smícháním a prášku a pufry

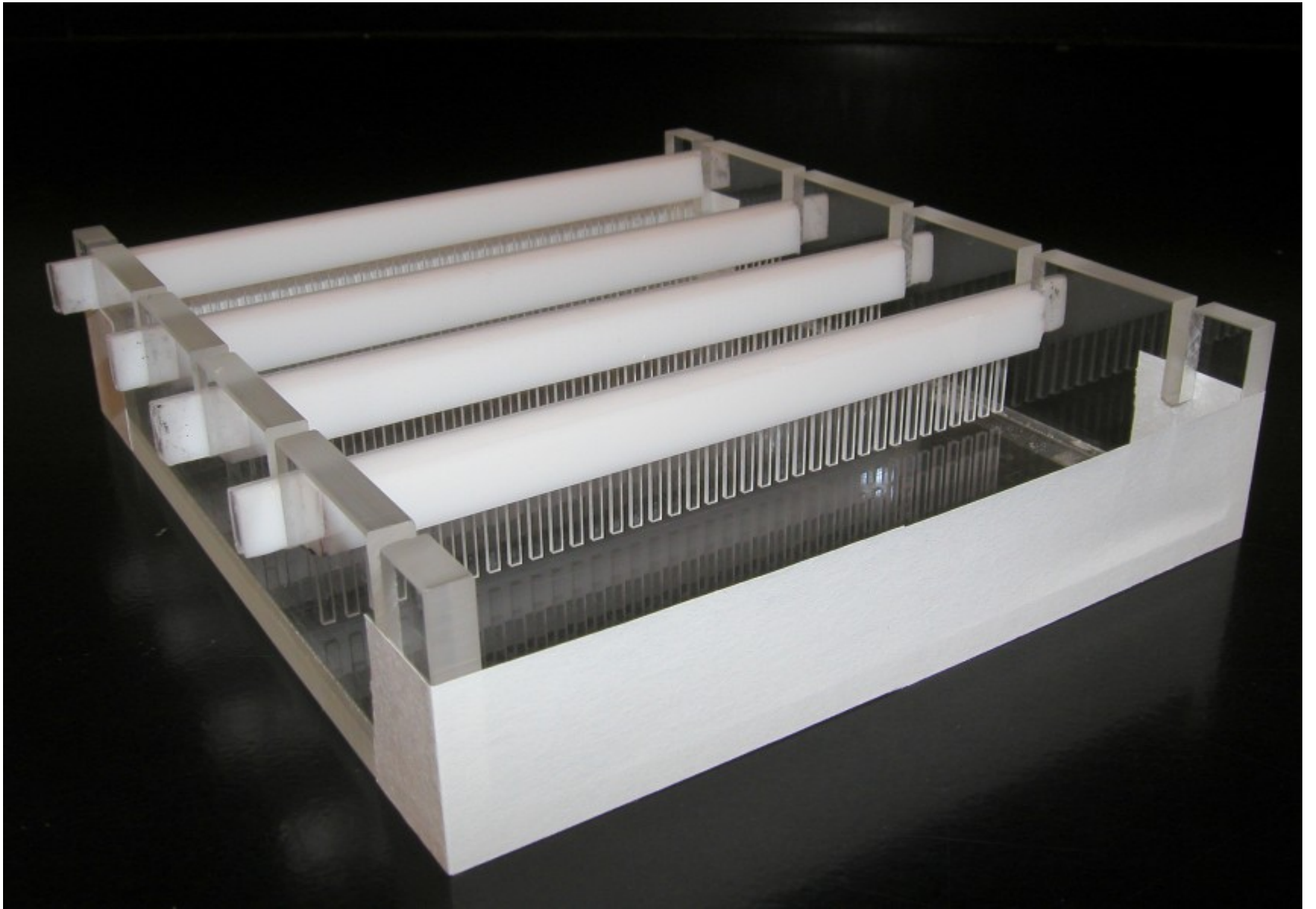
TBE Buffer ➤

Erlenka k přípravě ➤

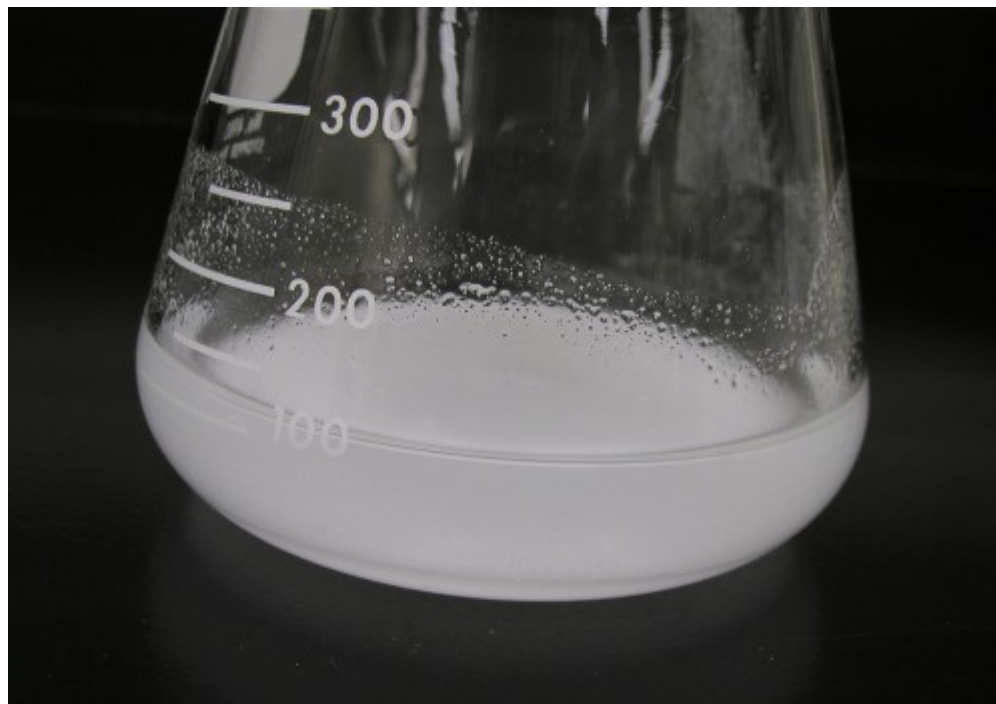
Agaróza ↖



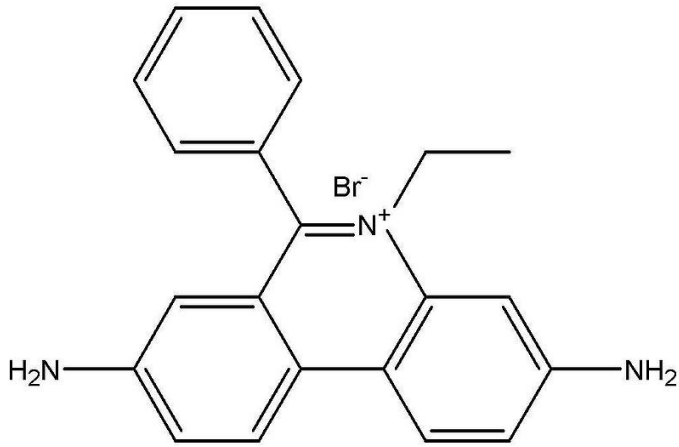




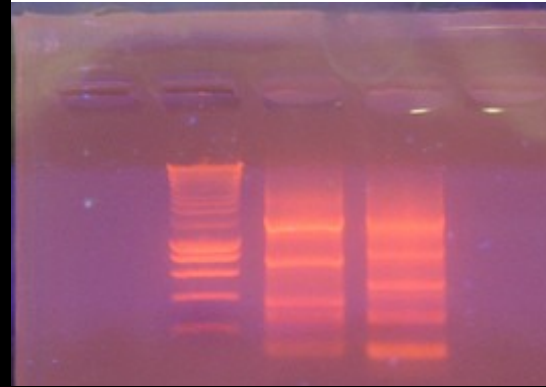




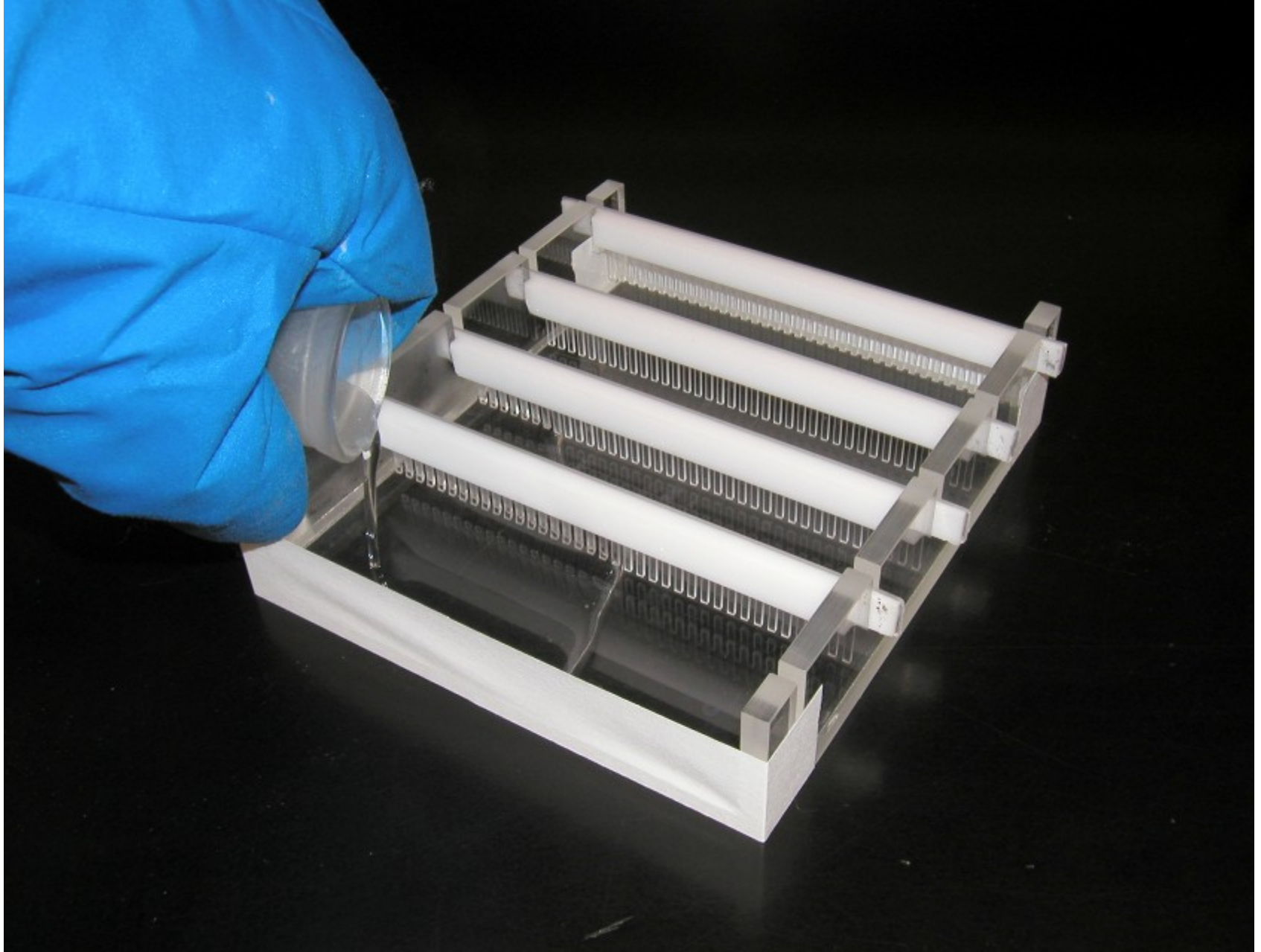
Ethidium Bromide

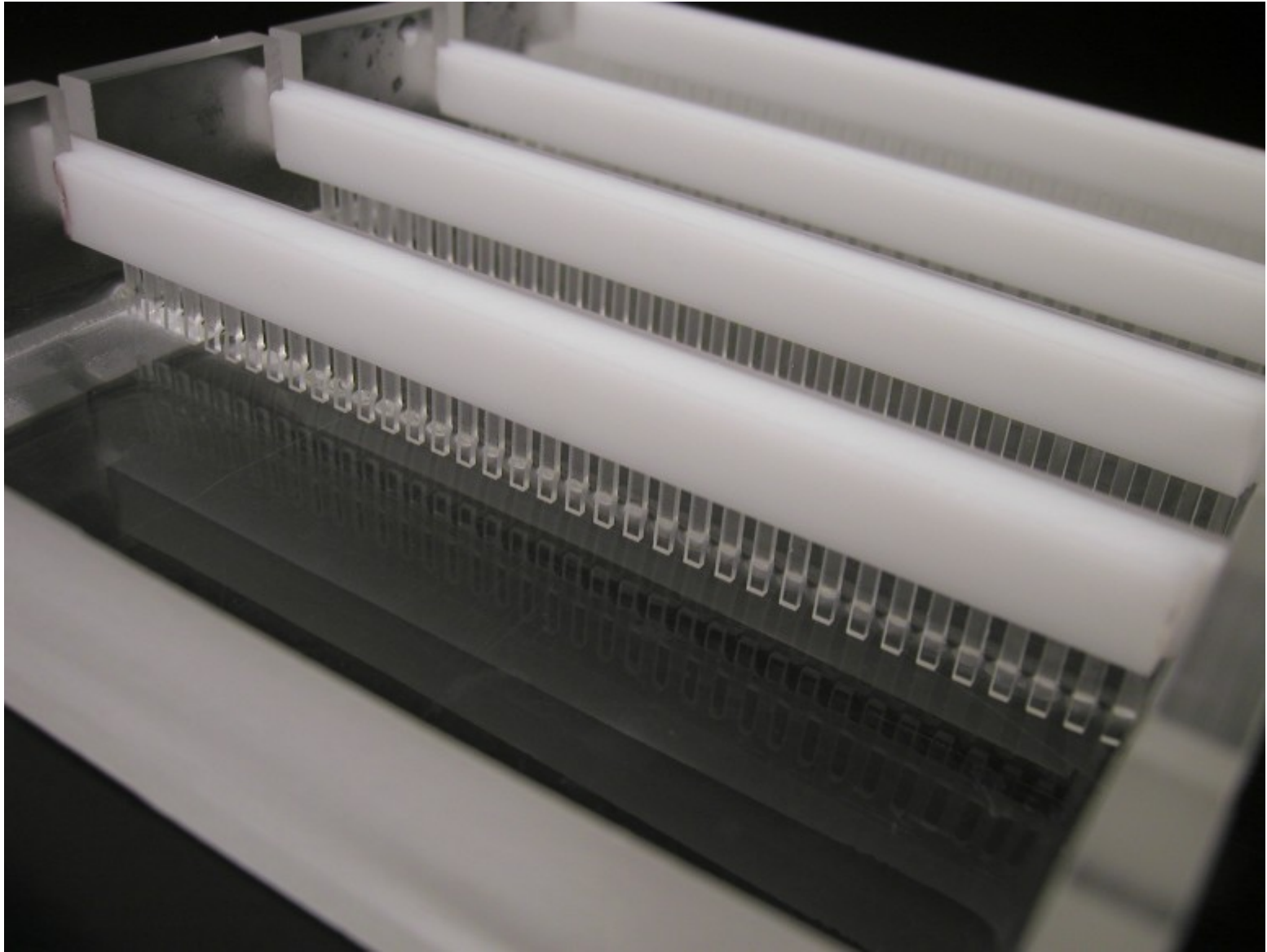


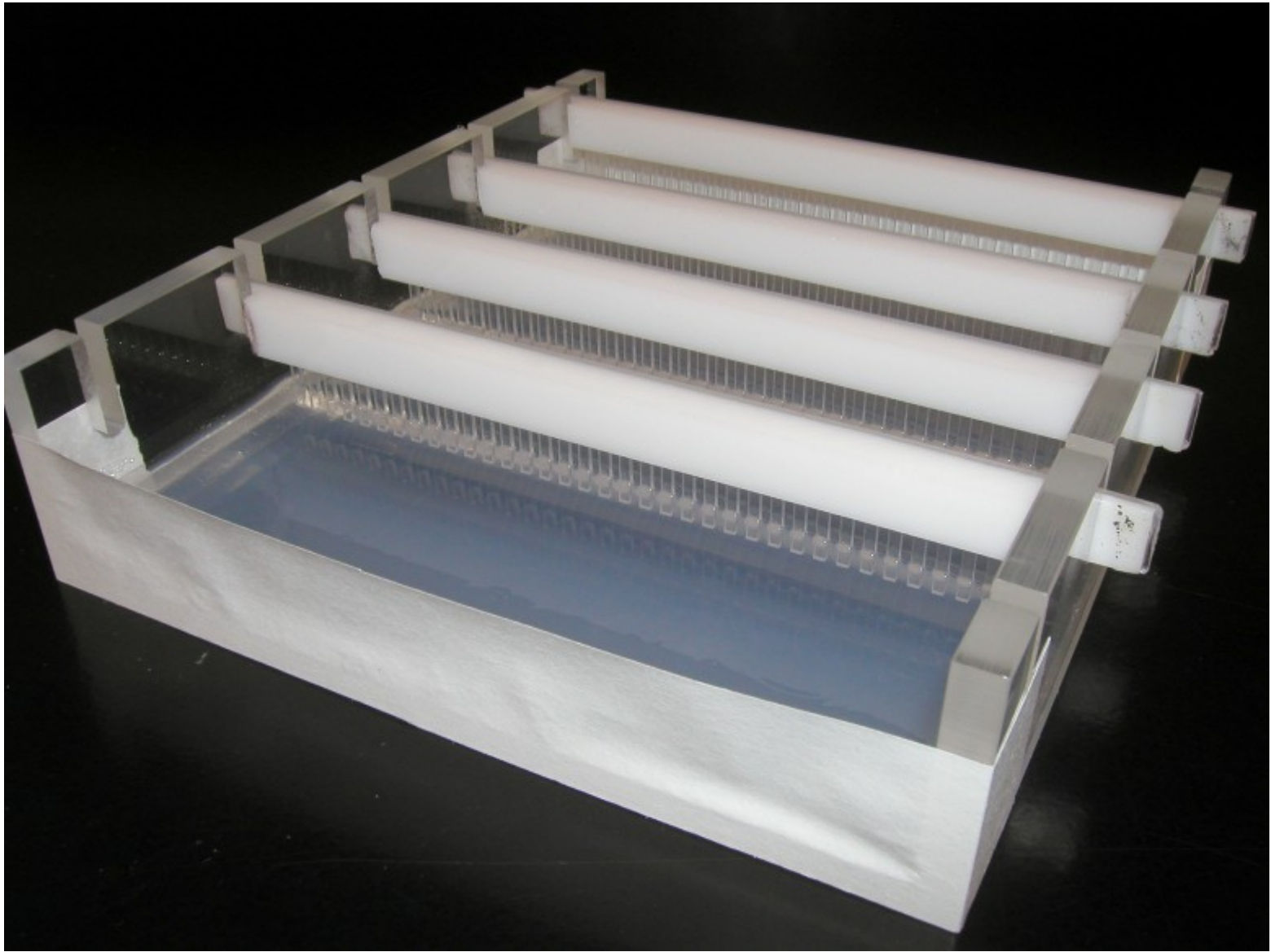
Interkaluje se do
NK a emituje
světlo po
ozáření UV
světlem



Mutagen!

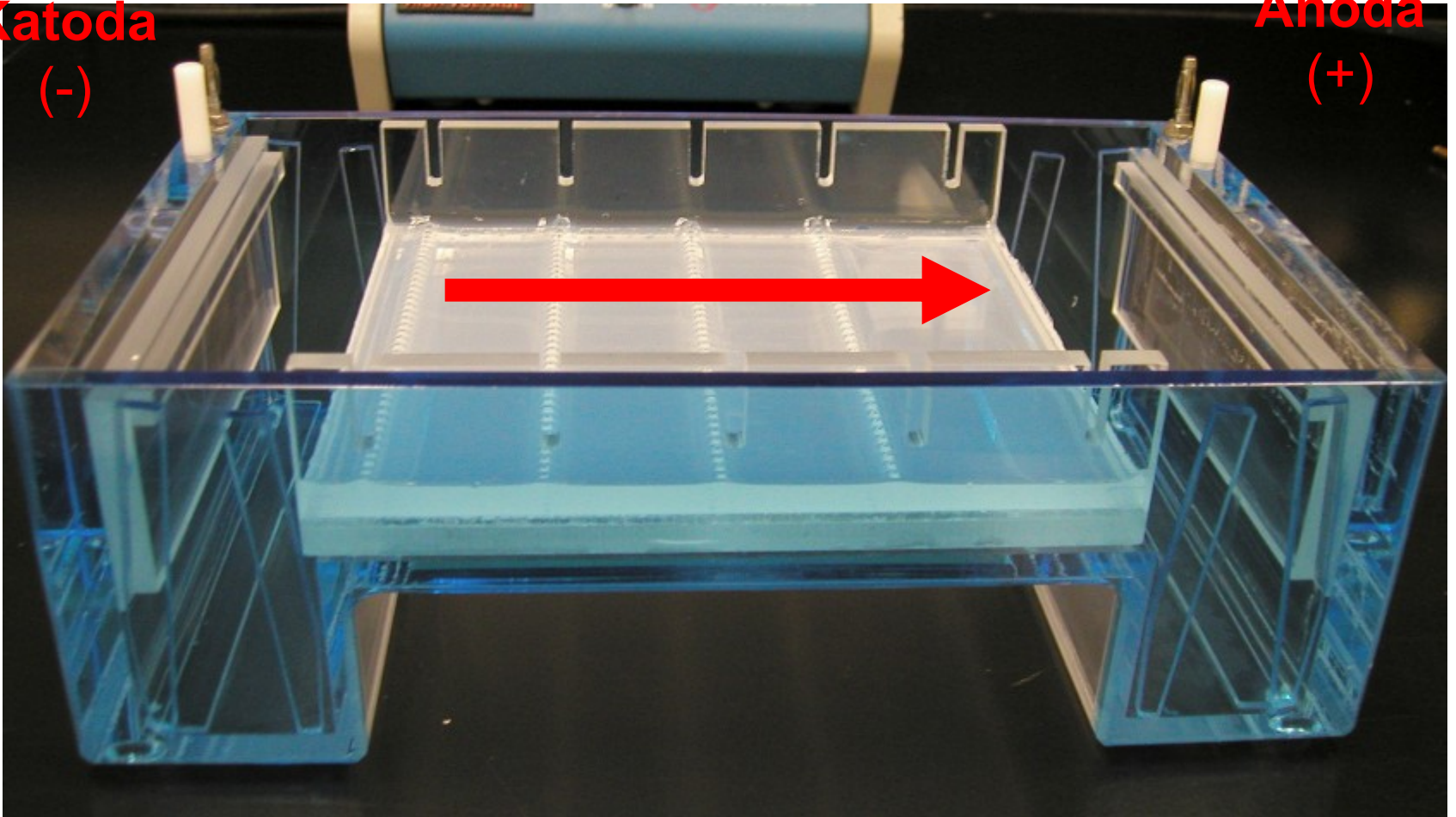






Katoda
(-)

Anoda
(+)



TBE buffer →

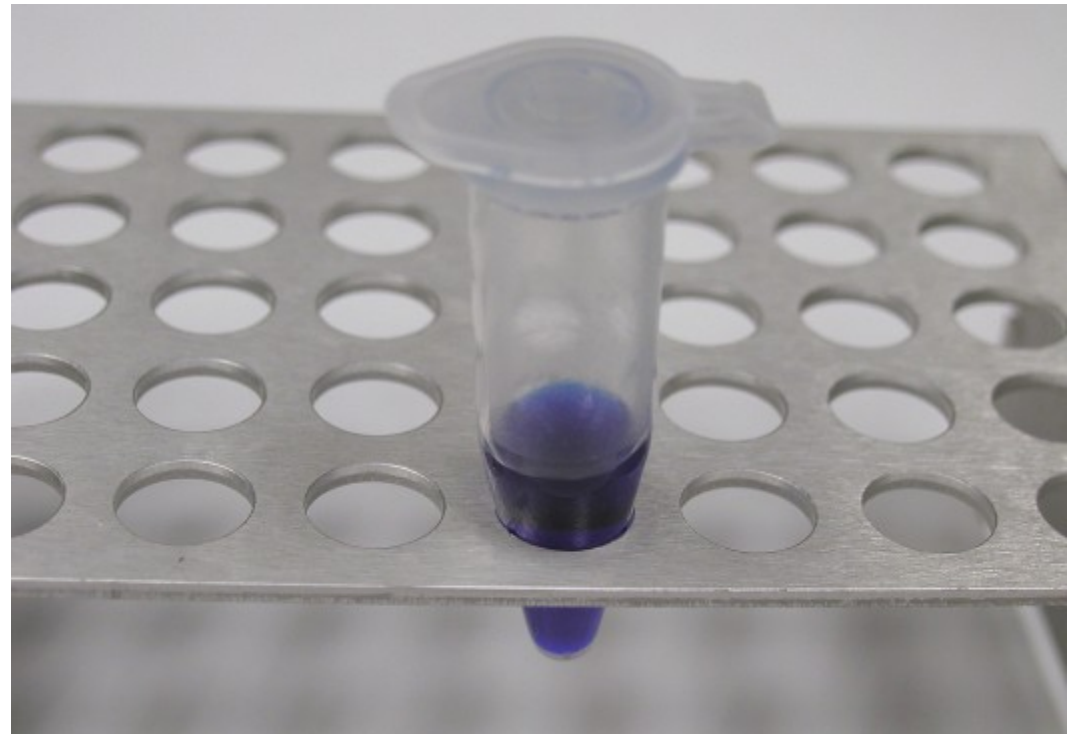


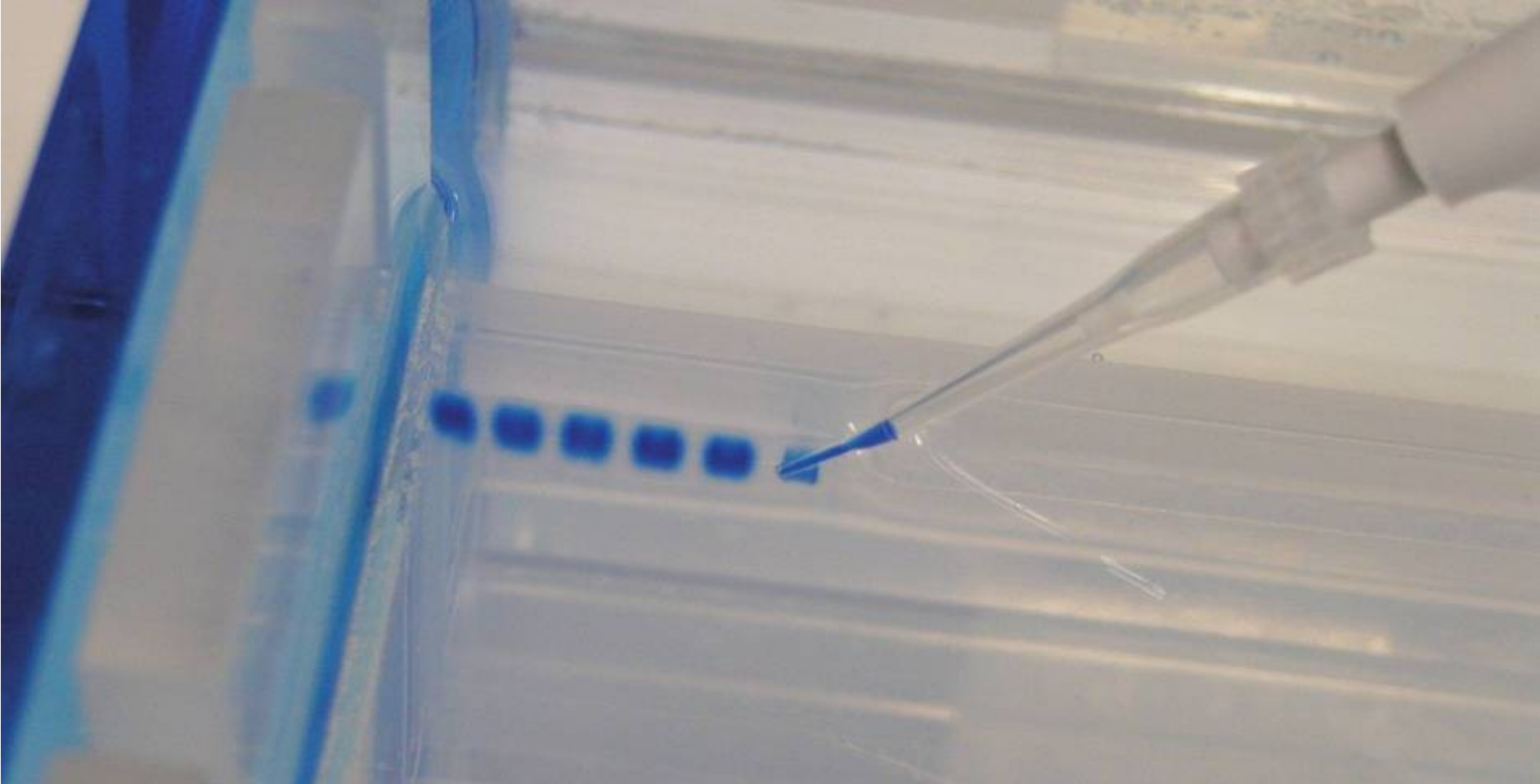
Nanášení vzorků

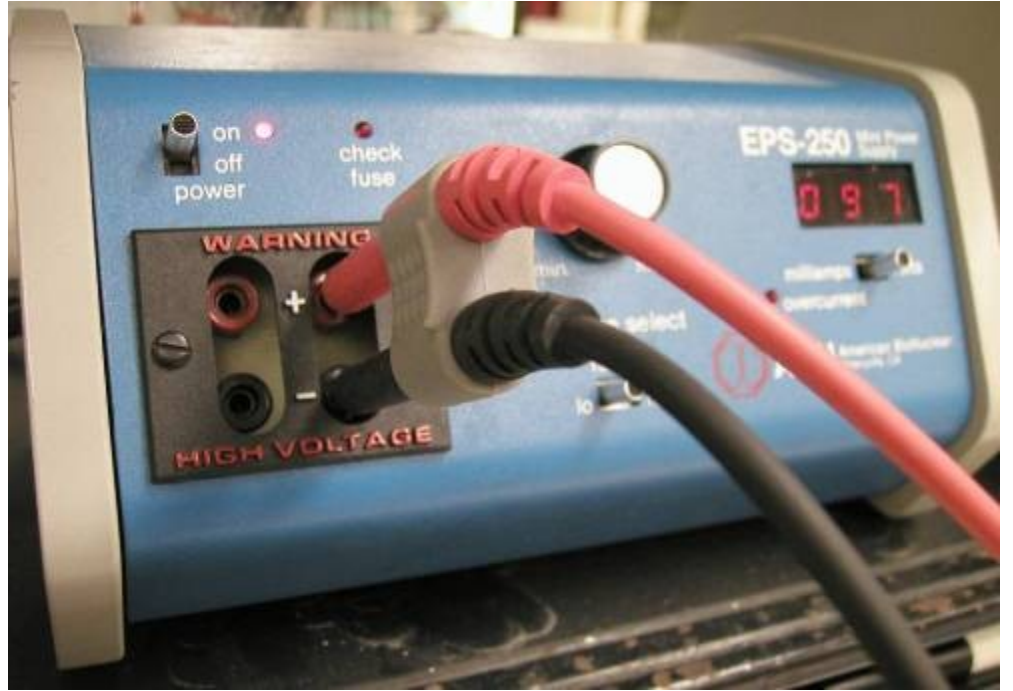
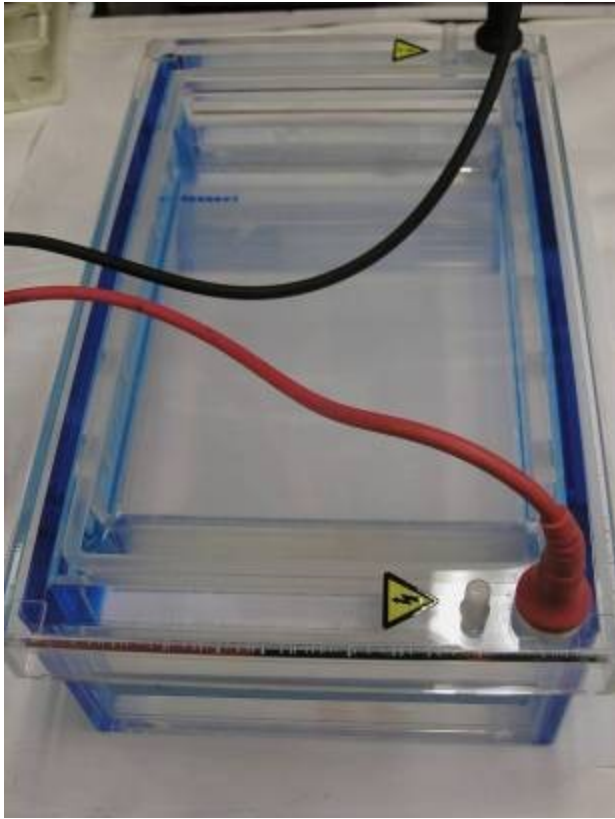
PCR produkty se smíchají s nanášecím pufrem – obarví je a zvýší denzitu – zabrání vyplavení vzorku z jamky

6X Loading Buffer:

- Bromfenolová modrá
- Glycerol



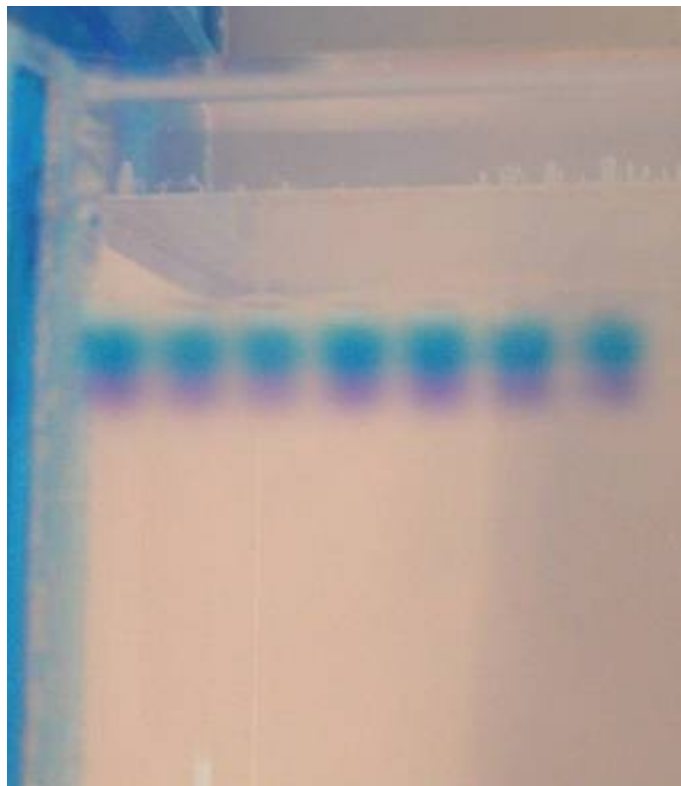




katoda
(-)

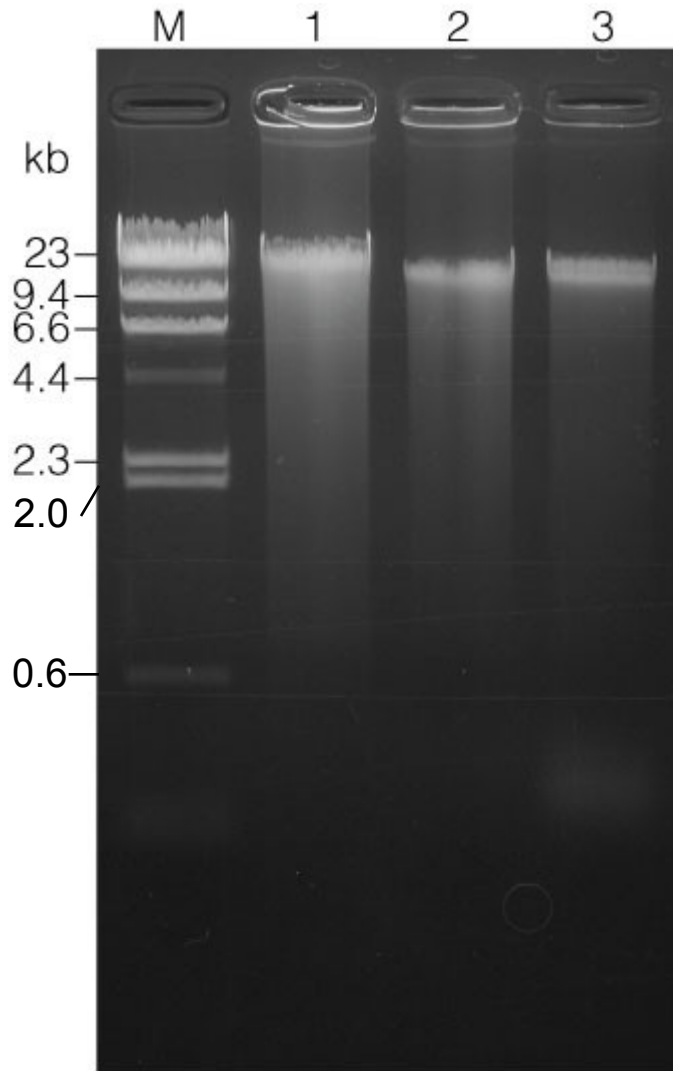
DNA
(-)
↓

anoda
(+)



← jamky
← Bromfenolová modř

...a pod UV světlem



‘Nikdy nevyhazujte
vzorky před
koncem
experimentu.’

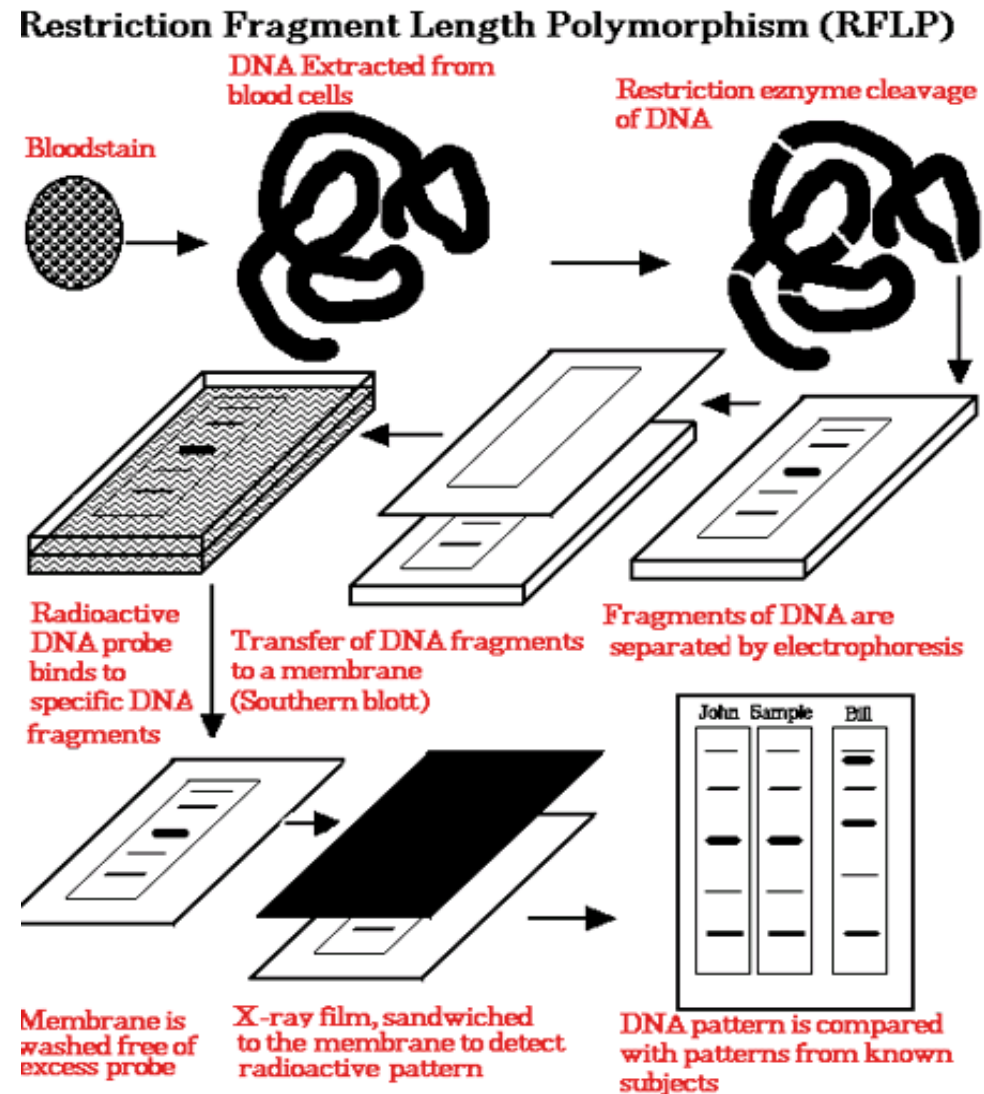


Hledání v odpadu
není nic moc!

Zdroj: www.flickr.com/photos/50262392@N00/45684291

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

- Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) je technika, kterou jsou organizmy odlišovány analýzou vzoru rýhování DNA

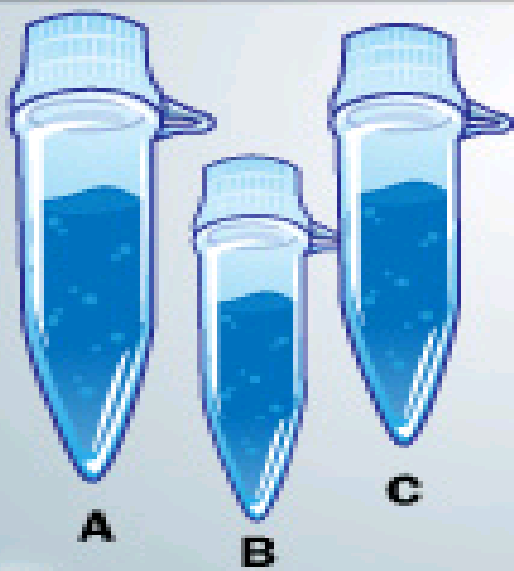


RFLP

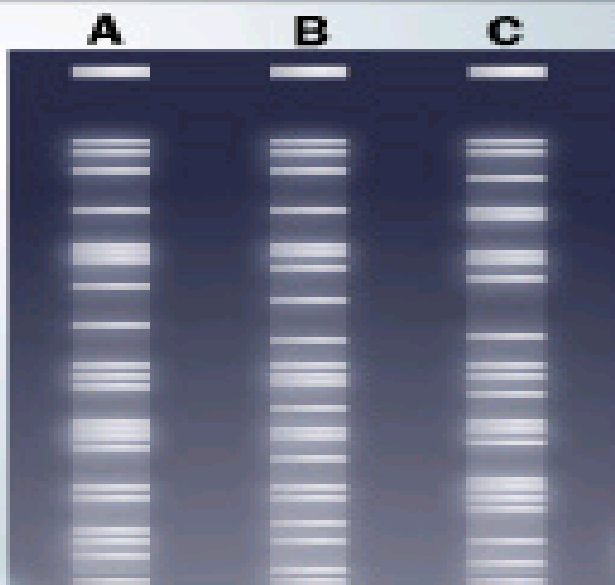
- Základním způsobem detekce RFLP je fragmentace DNA restrikčními enzymy, které rozpoznají specifické místo na DNA. Výsledné DNA fragmenty jsou pak separovány dle délky pomocí elektroforézy a přeneseny na membránu technikou Southern blot

How the RFLP Process Works

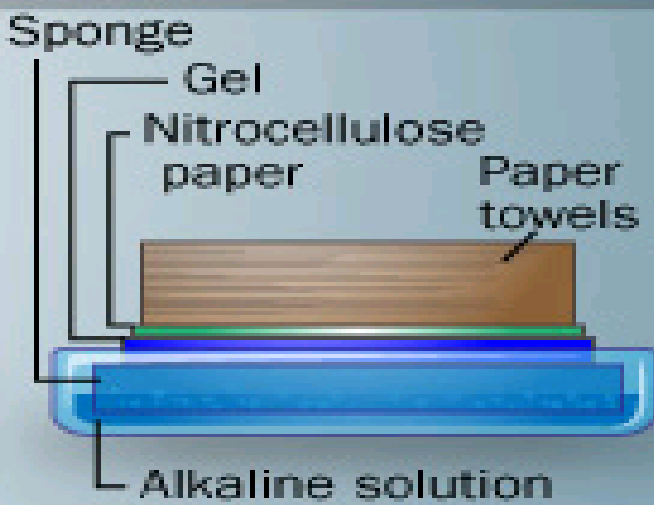
©2008 HowStuffWorks



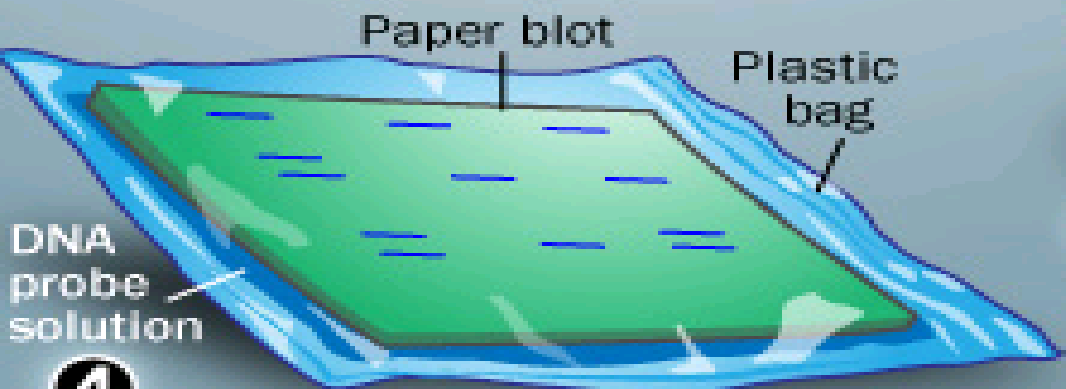
1 DNA Samples with added restriction enzymes produce restriction fragments.



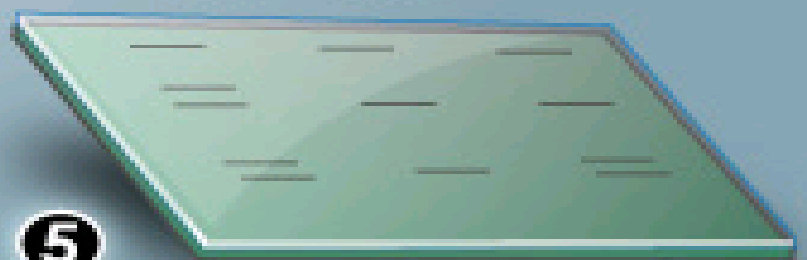
2 Electrophoresis separates the restriction fragments. Each sample forms a characteristic pattern of bands.



3 Alkaline solution is pulled upward through the gel to a sheet of nitrocellulose laid on the top of it, transferring the DNA to the paper.

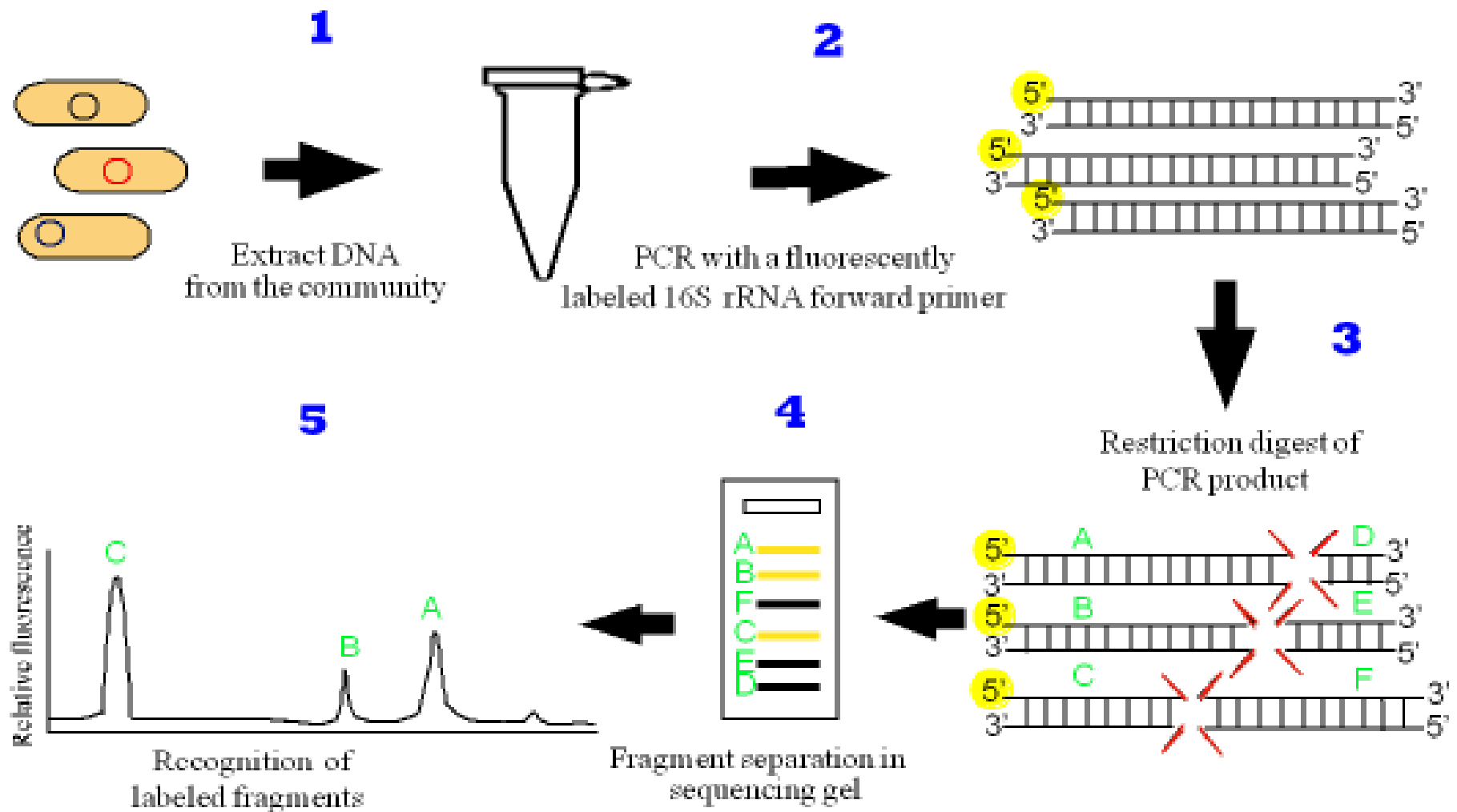


4 The paper is exposed to a solution containing radioactively-labeled probe.



5 A photographic film laid on top of the paper is exposed by the radioactivity in the bound probe to form an image corresponding to the DNA bands.

Tvorba fragmentů



Arber, Nathans and Smith – Nobel Prize 1978

- Restrikční endonukleázy jsou základem molekulární genetiky, genetického inženýrství a rekombinantních DNA technologií
- Několik typů – nejčastější Eco R I HIND III

Co je blotting?

- **Bloty jsou technikou přenosu DNA (Southern), RNA (Northern) nebo proteinů (Western) na nosiče, aby mohly být separovány pomocí elektroforézy**
- **Hybridizace radioaktivní sondy na filtraci navázané NK je nejinformativnějším experimentem v molekulární genetice**

TYPY BLOTTING TECHNIK

Blotting technique

```
graph TD; A[Blotting technique] --> B[Southern Blot]; A --> C[Northern Blot]; A --> D[Western blot]; B --- B_desc[K detekci DNA]; C --- C_desc[K detekci RNA]; D --- D_desc[K detekci proteinů];
```

Southern Blot

K detekci DNA

Northern Blot

K detekci RNA

Western blot

K detekci proteinů



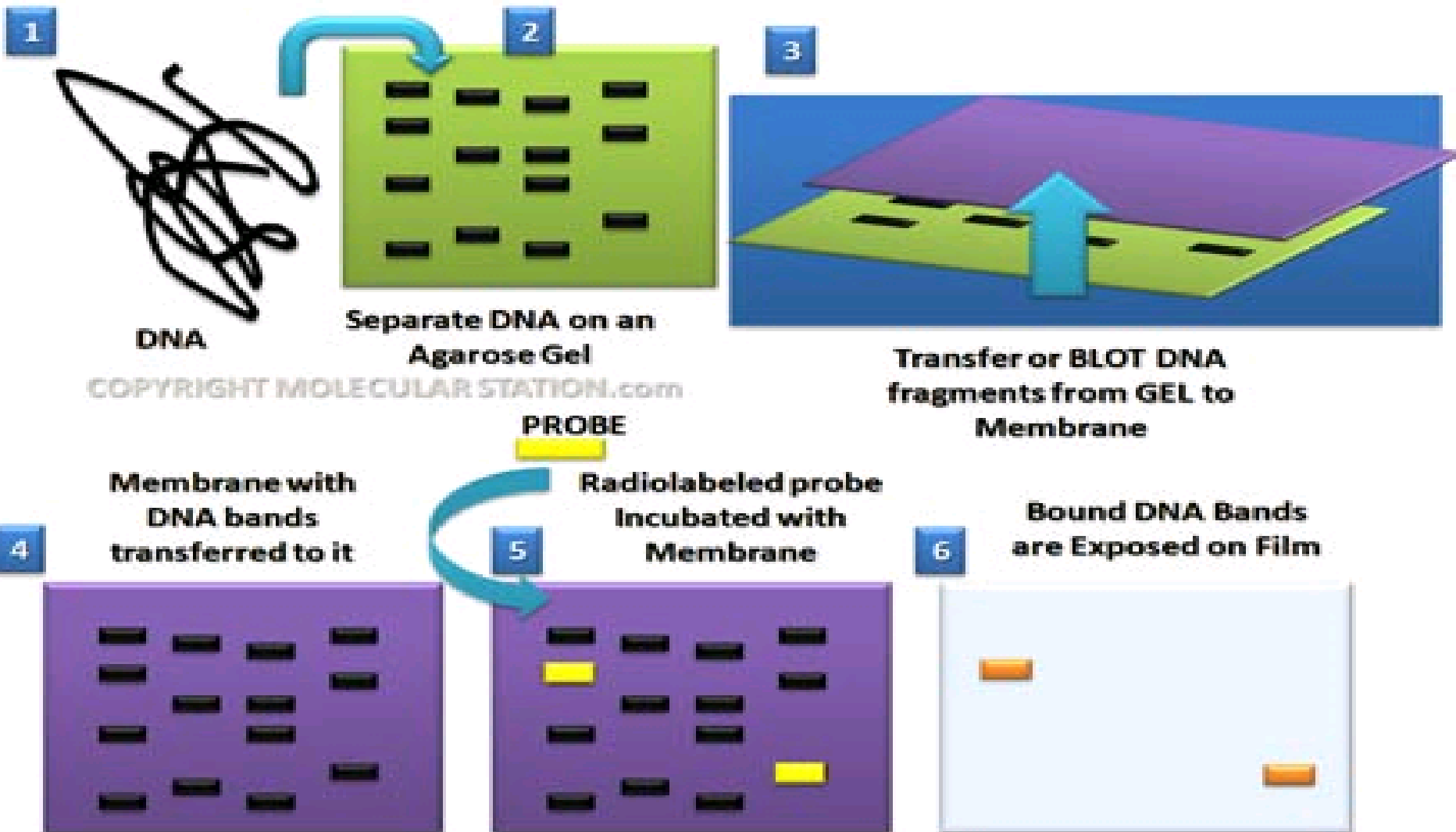
Sir Edwin Southern,
Profesor
Biochemie

- Vyvinul svou metodiku r. 1975.

Profesor Sir Edwin Southern

Southern Blot

working protocol



Využití Southern blottingu

- Objevování a mapování genů, evoluční a vývinové studie, diagnostika a forenzní studie
- Definitivní potvrzení u GMO o úspěšné inkorporaci inzertu do hostitelského genomu
- Předpovědi rakoviny v prenatální diagnostice genetických onemocnění