

Úloha č. 5

URČENÍ BAKTÉRIE RODU BORRELIA POMOCÍ DNA SEKVENACE

SEKVENACE DNA

sekvenační techniky:

- 1977 Maxam-Gilbertova metoda

- 1980 Sangerova metoda
 - automatizovaná varianta

- metody nové generace
 - pyrosekvenování, SOLID, SOLEXA

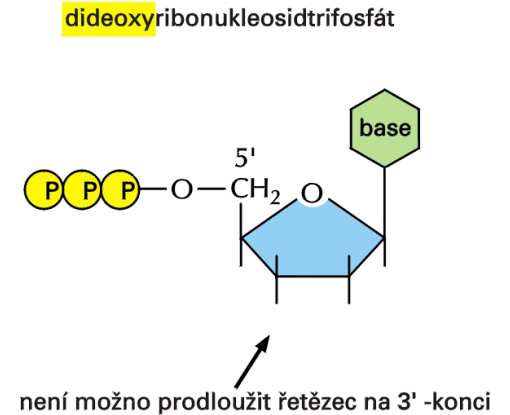
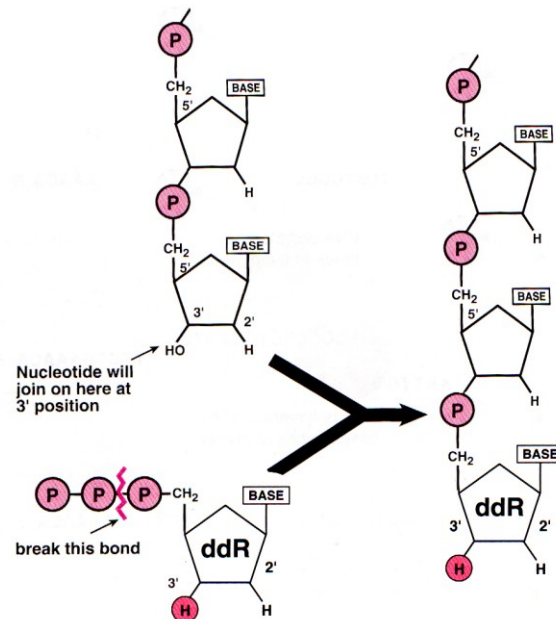
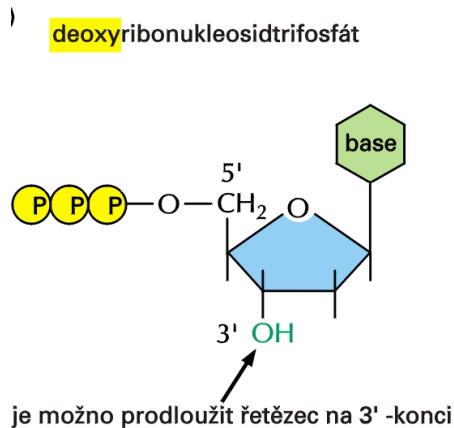
SANGEROVA METODA

DNA polymerasa

primer

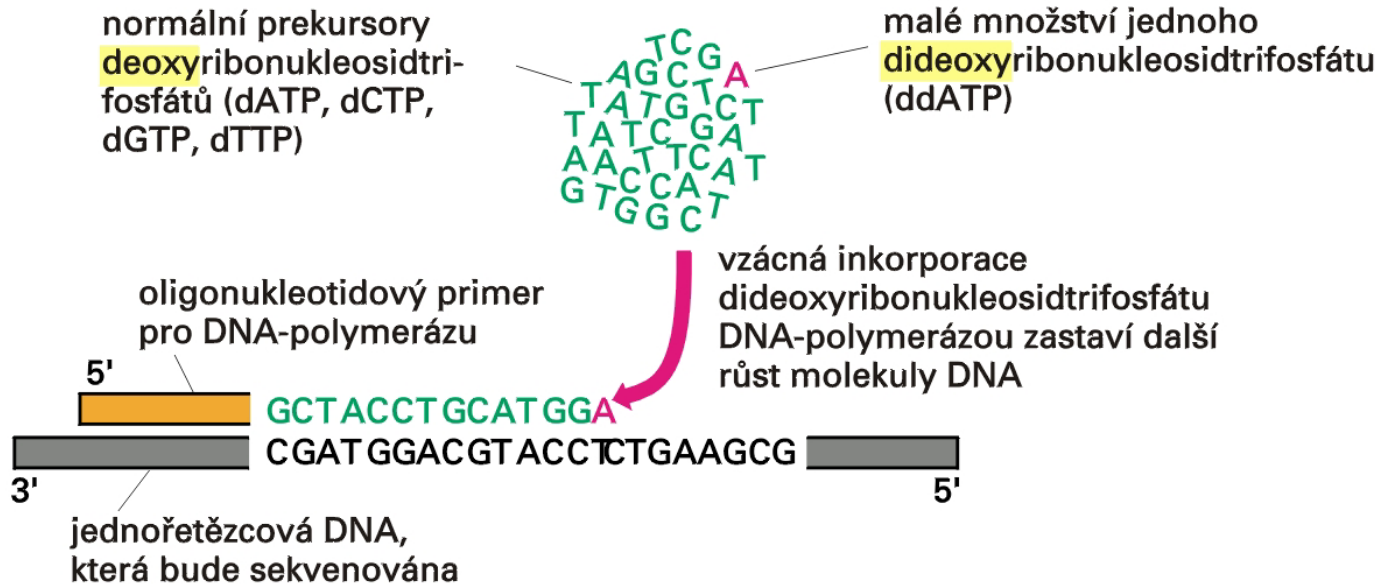
2'-deoxynukleosidtrifosfáty (dNTP)

2',3'-dideoxynukleosidtrifosfáty (ddNTP)



SANGEROVA METODA

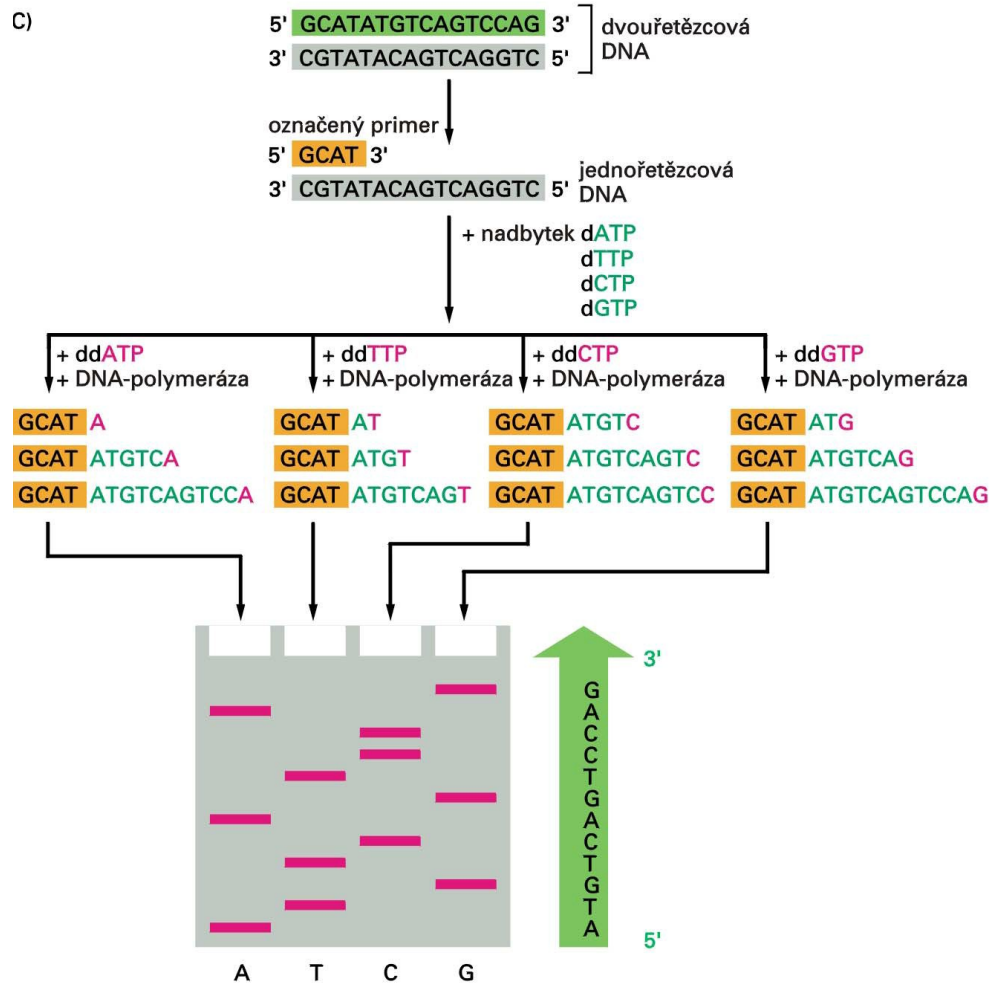
využití ddNTP



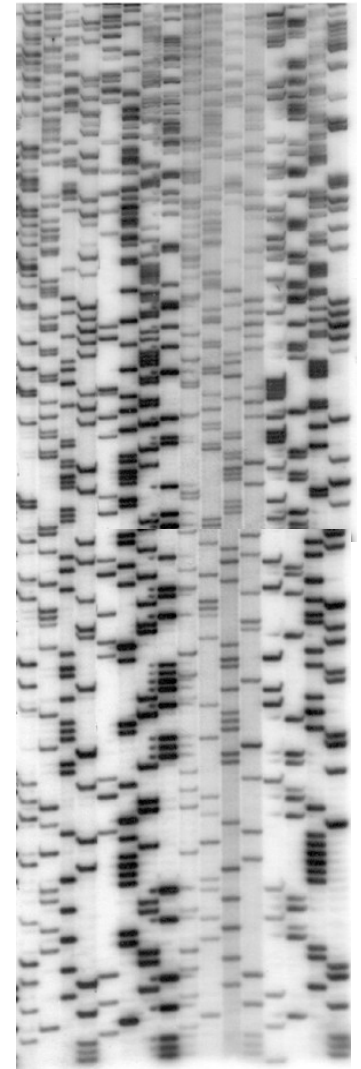
SANGEROVA METODA

průběh a detekce

c)



Obraz autoradiogramu ze sekvenačního gelu



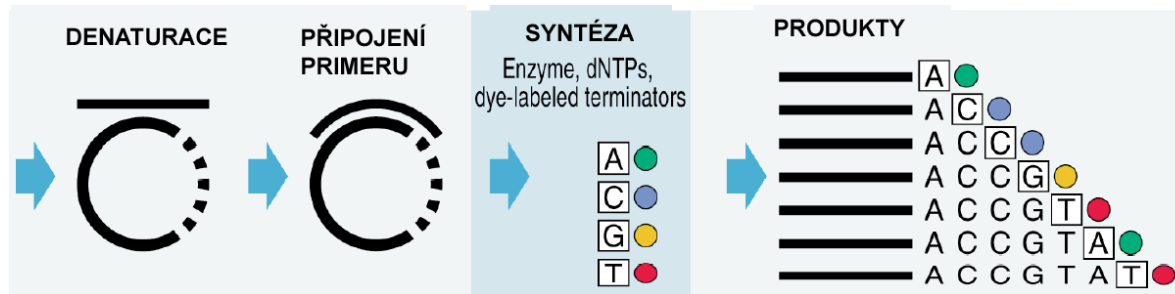
ATGC ATGC ATGC ATGC

AUTOMATIZOVANÁ VARIANTA

- varianta enzymatického sekvenování DNA
- amplifikace DNA na termocykléru (PCR) a elektroforetická separace fragmentů na sekvenátoru
- syntéza DNA probíhá v jedné reakci

značení a detekce: ddNTP

čtyři různé fluorescenční značky

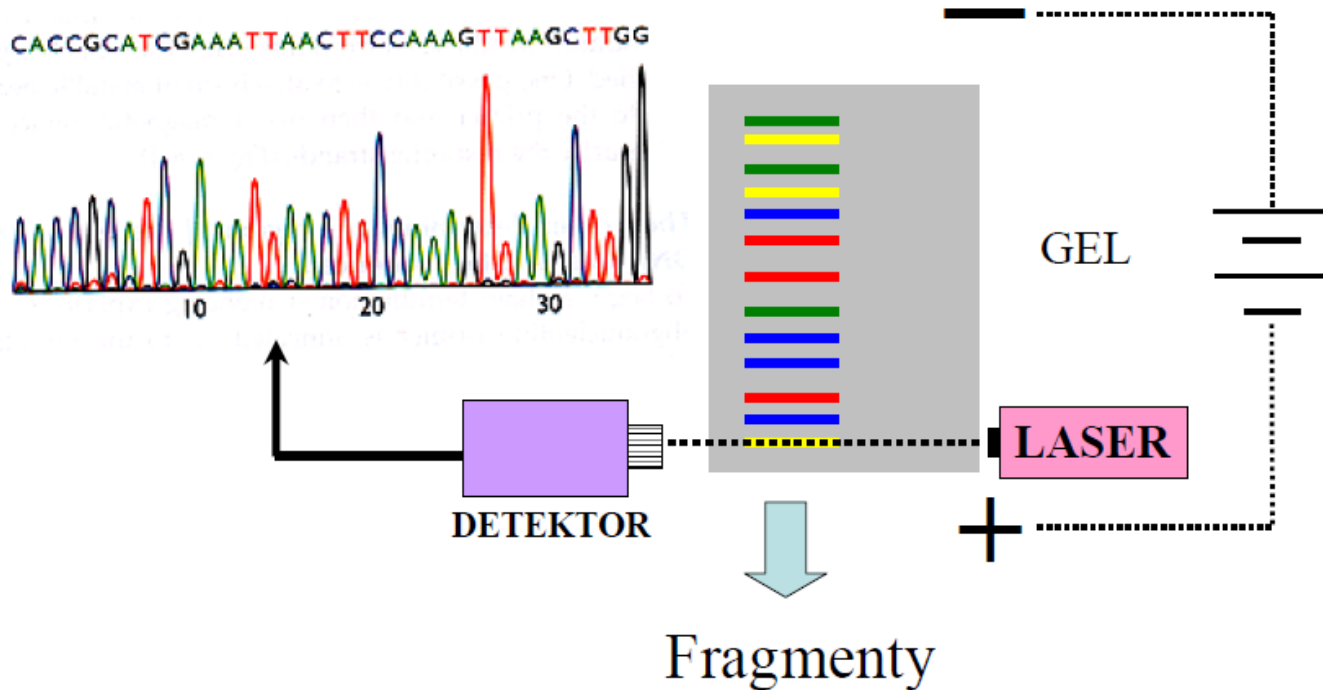


- produkty se liší o 1 bázi

Genetický analyzátor ABI 3130



DETEKCE PRODUKTŮ



POSTUP

- přečištění ExoSAP
- sekvenační reakce
- přečištění magnetickými kuličkami
- sekvenace
- vyhodnocení výsledků a určení druhu borrelie