



# **Enzymy používané při manipulaci s nukleovými kyselinami**

**doc. RNDr. Milan Bartoš, Ph.D.**

**bartosm@vfu.cz**

**Přírodovědecká fakulta MU, 2012**

# ***Obsah přednášky***

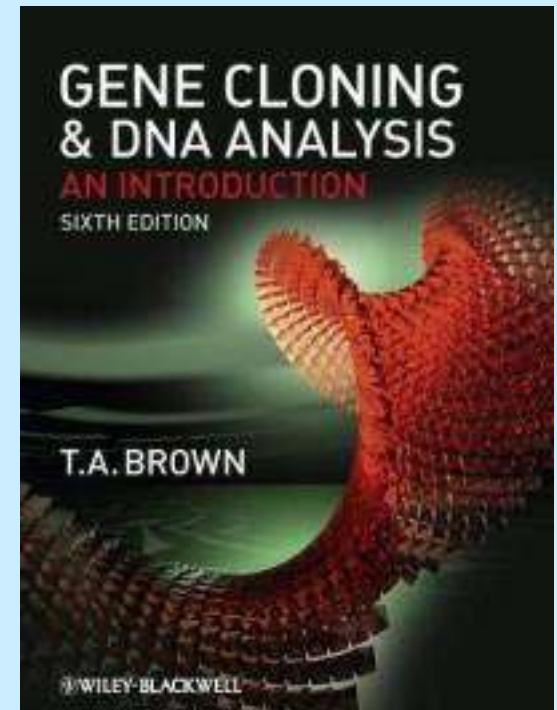
- 1) Přehled a funkce enzymů**
- 2) Restrikční endonukleázy – opakování**
- 3) Restrikční mapy**
- 4) Detekce polymorfismů v genomech**
- 5) DNA fingerprinty**
- 6) Proteinové fingerprinty**



## *Doporučená literatura*

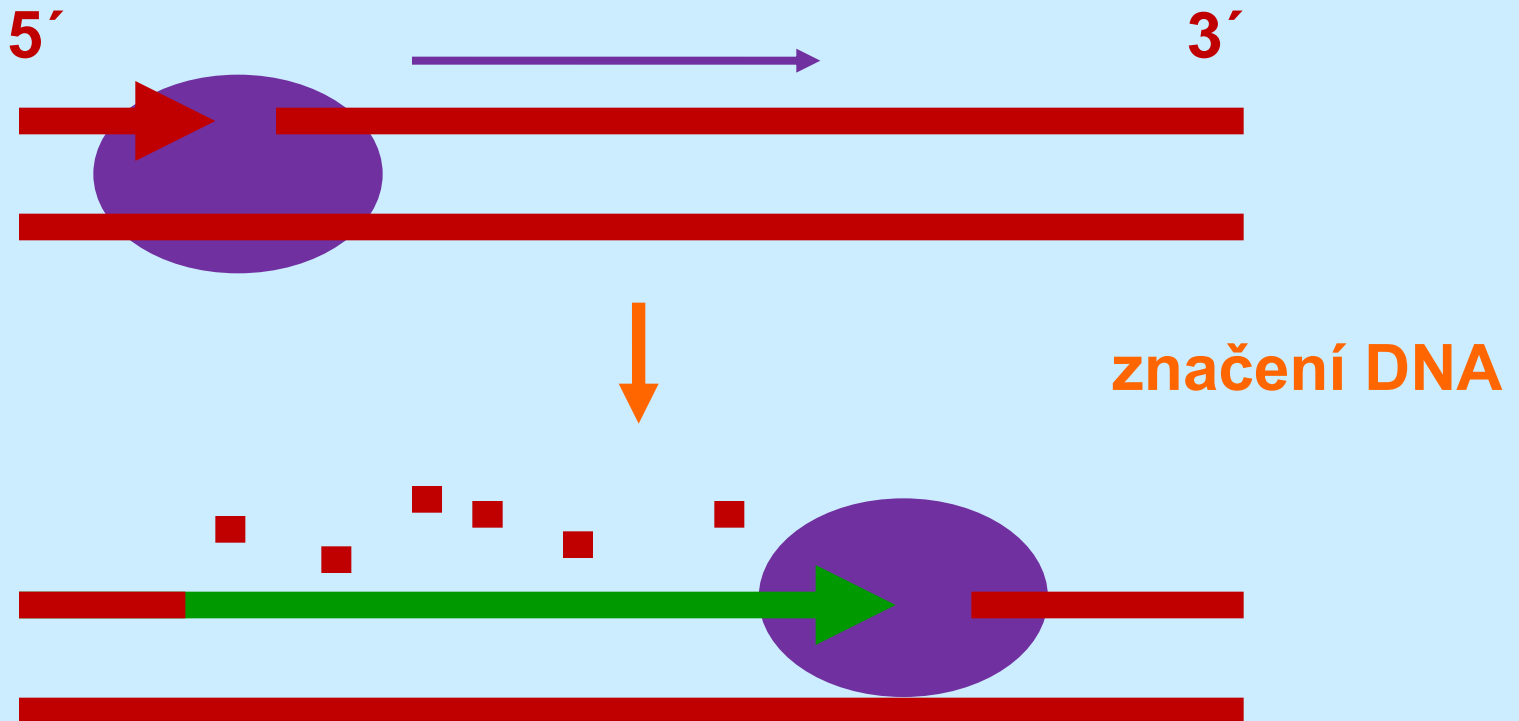
**Brown (2010): Gene Cloning & DNA Analysis. Wiley-Blackwell, Sixth edition**

**katalog firmy New England Biolabs, USA, [www.neb.com](http://www.neb.com)**



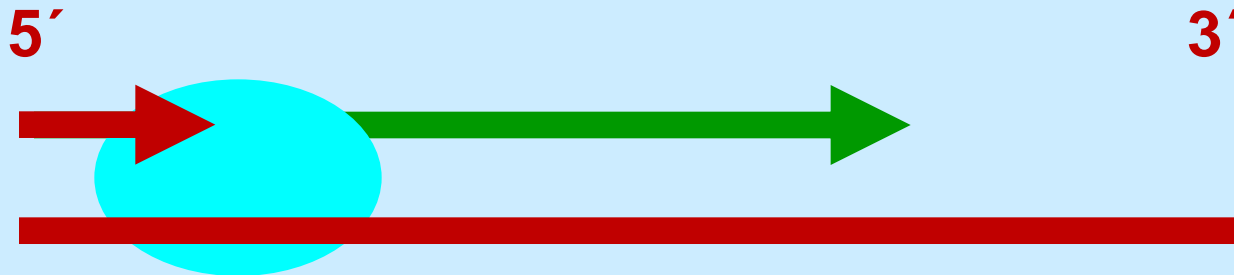
# *DNA polymeráza I*

- syntéza ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'



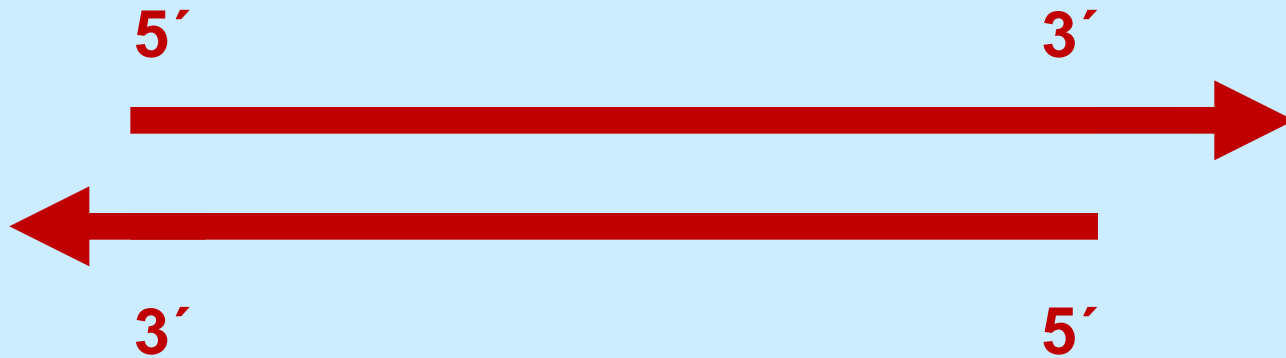
# *Klenowův fragment*

- syntéza ve směru 5' - 3'
- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'
- tam, kde se neodbourává primer
- sekvenování, značení DNA

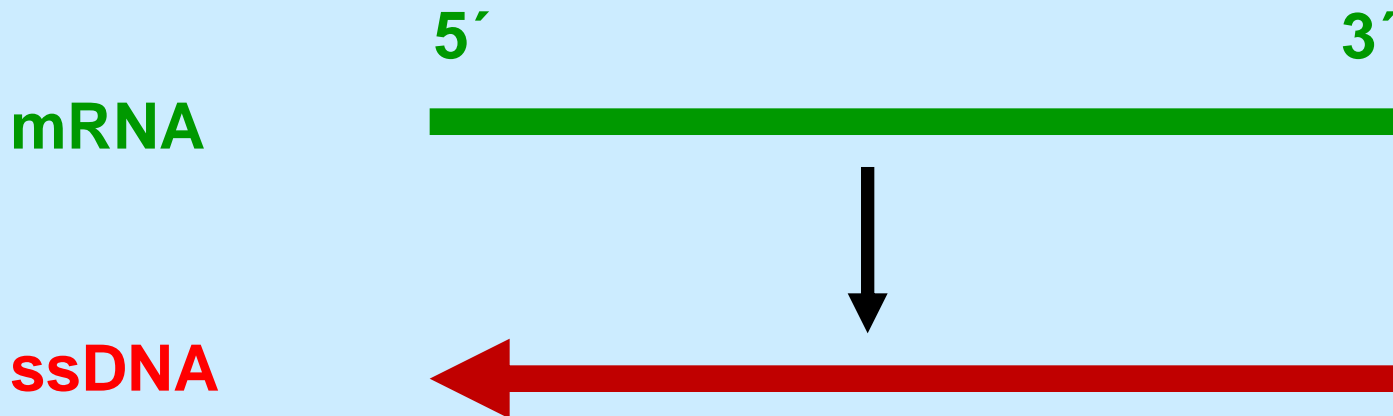


# *Další enzymy - I*

**Terminální deoxyribonukleotidyltransferáza**

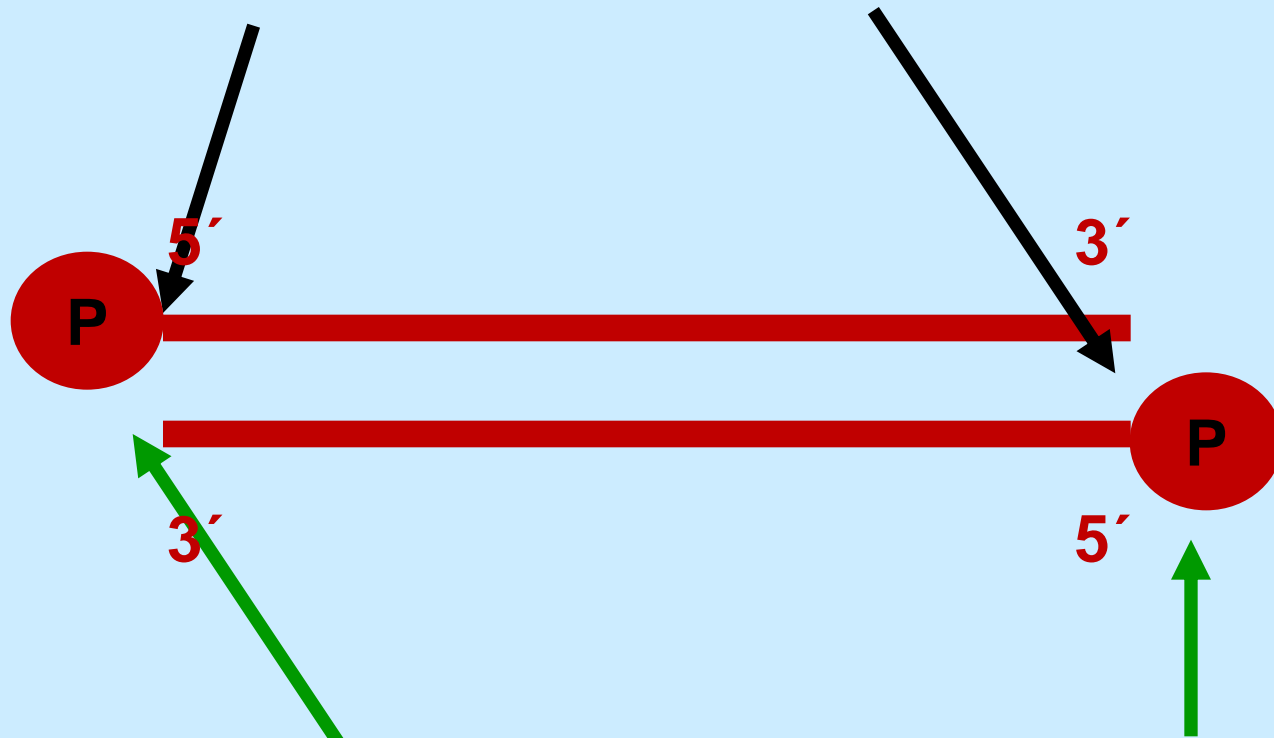


**Zpětná transkriptáza**



# Fosfatázy a kinázy

Fosfatázy - Alkalická fosfatáza (telecí střevo)

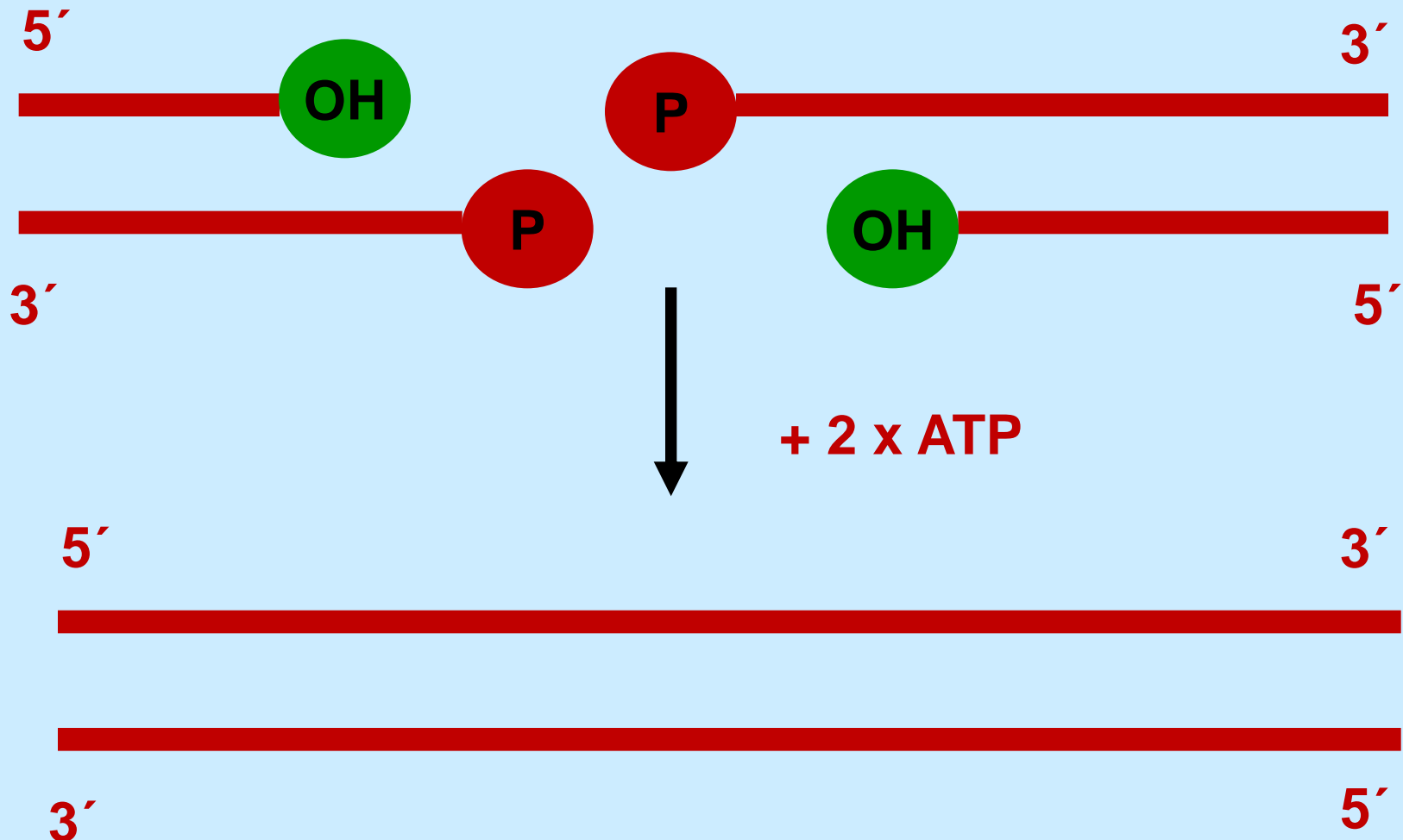


Kinázy - T4-polynukleotidkináza  
(*E.coli* infikované bakteriofágem T4)

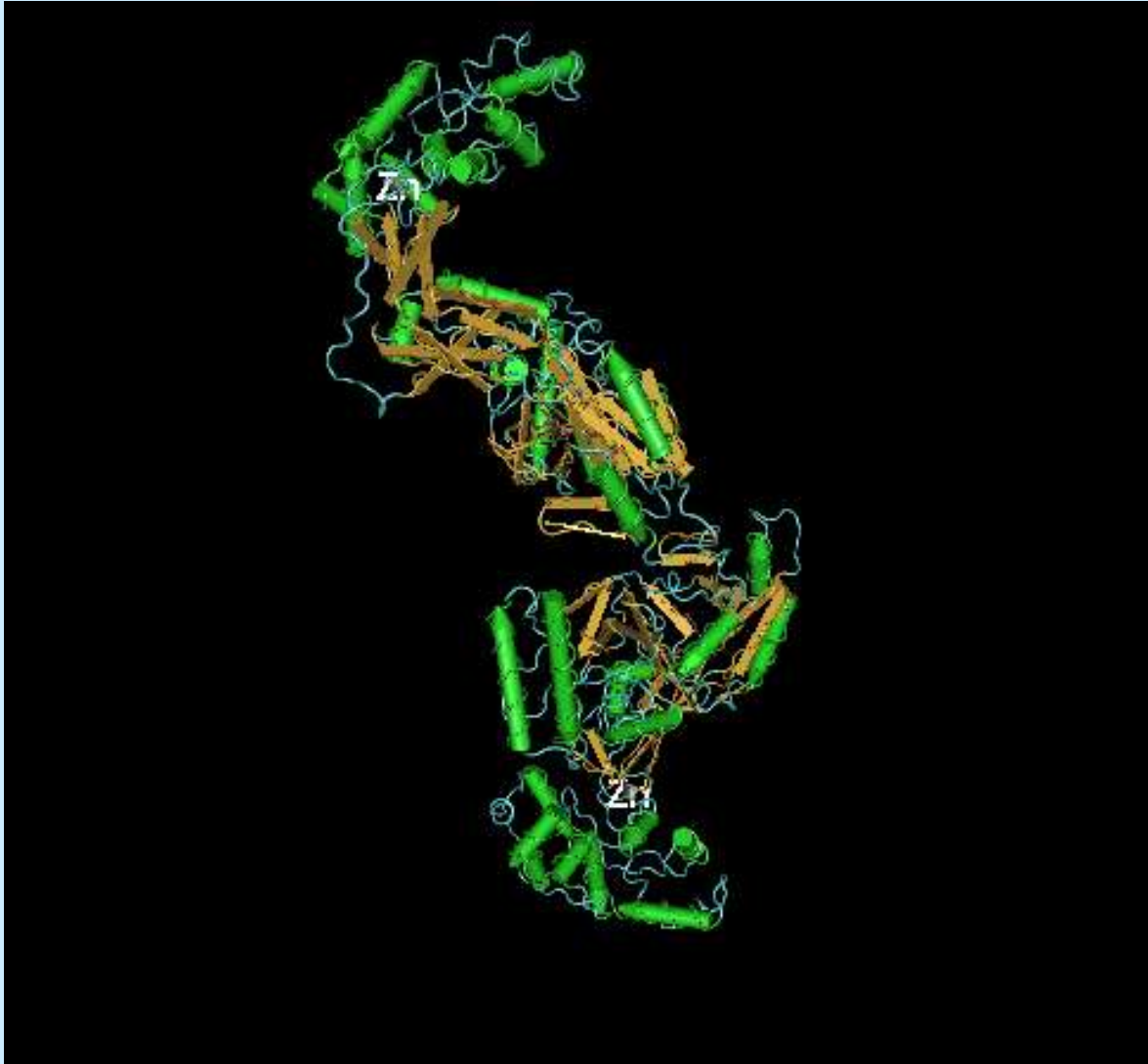


# Ligáza

T4 DNA ligáza (*E. coli* infikované bakteriofágem T4)



# *Ligáza*



# Ligace – spojení dvou fragmentů DNA



↑ samovolné připojení



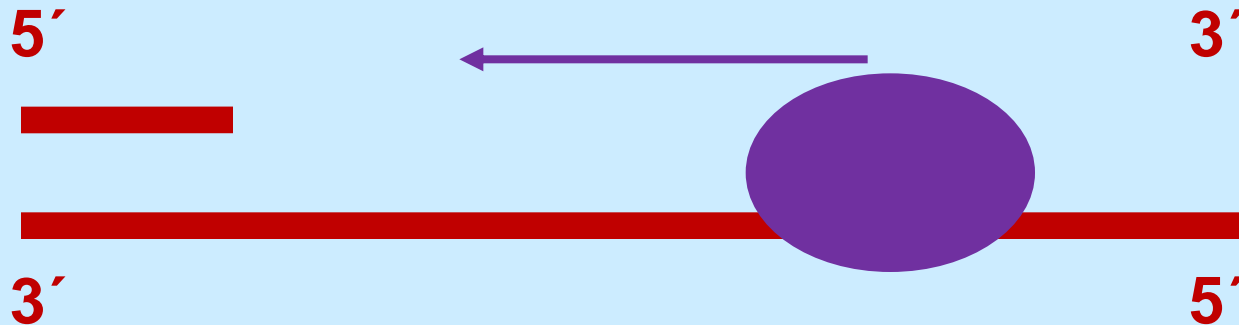
spojení ligázou

+ 2 x ATP



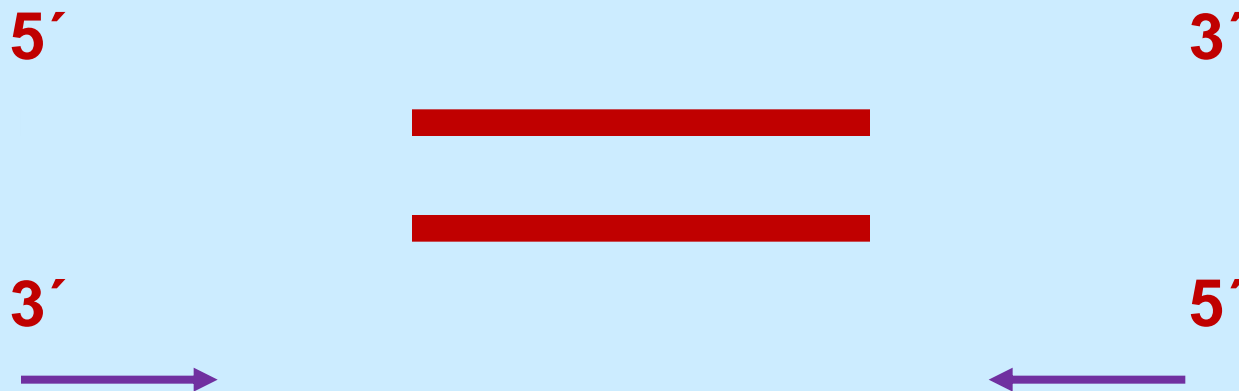
# *Exonukleáza III (E. coli)*

- exonukleázové odbourávání ve směru 3' - 5'
- odbourává 3'-OH konec



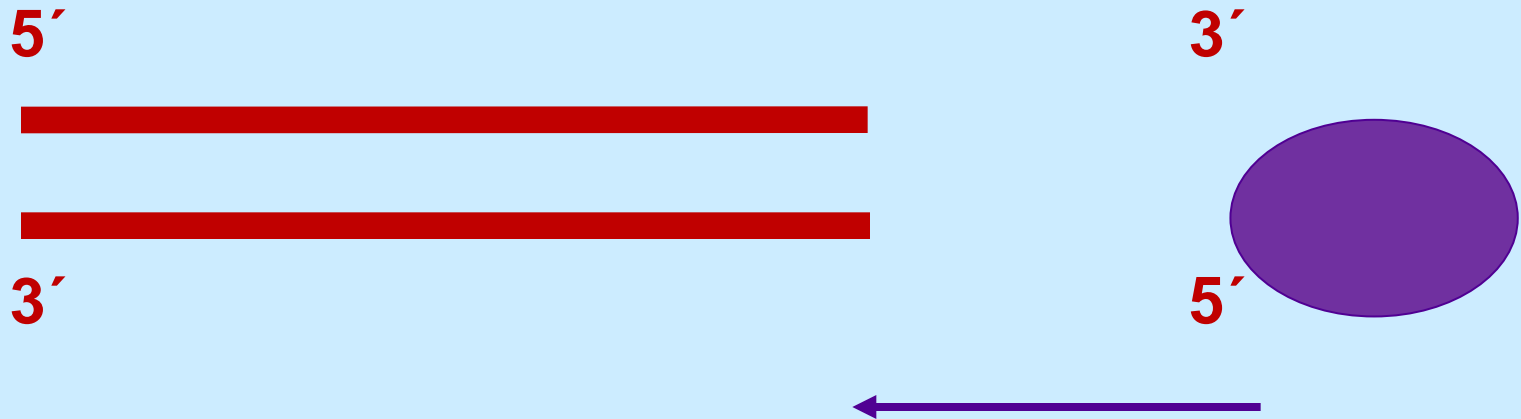
# *Exonukleáza Bal 31*

- štěpí lineární dsDNA z obou konců
- zkracuje DNA fragmenty
- konce jsou zarovnané



# *S1 nukleáza (Aspergillus oryzae)*

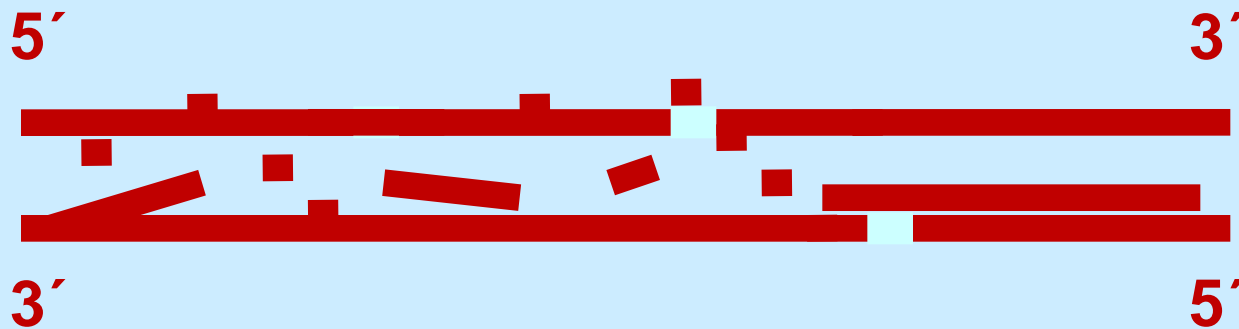
- specifická pro ssDNA
- odstraňuje jednořetězce na dsDNA



# Deoxyribonukleázy

## DNáza I (hovězí pankreas)

- nespecifická
- vytváří jednořetězcové zlomy
- následně DNA odbourává na mono a oligonukleotidy



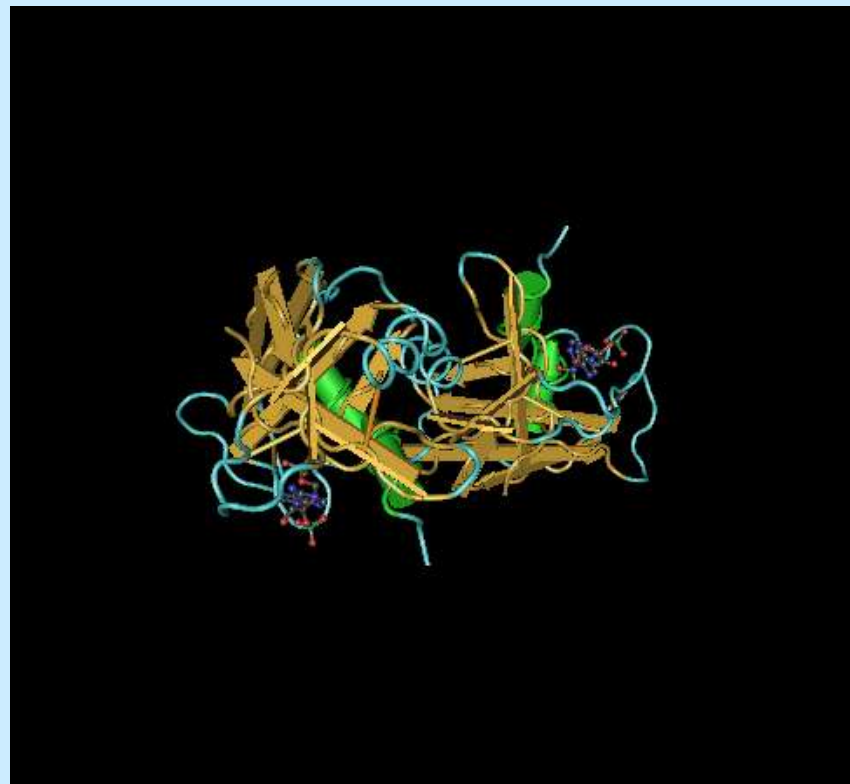
# ***DNáza I***





# *Ribonukleázy*

- **nespecifické i specifické**
- **odbourávají RNA**
- **používají se k odstranění RNA ze vzorků s DNA**
- **extrémně stabilní enzymy**

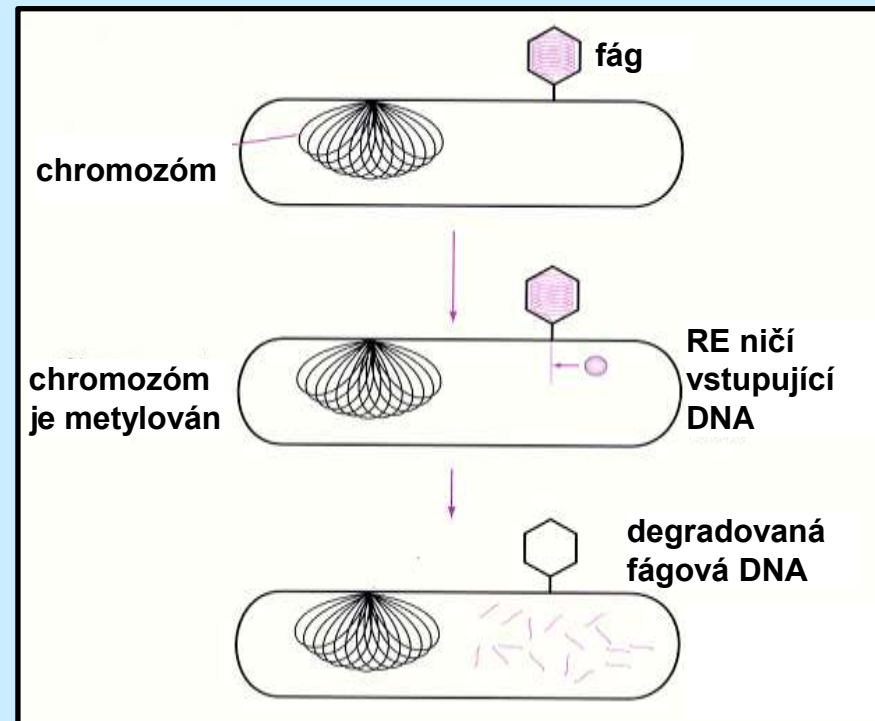


# ***Restrikční endonukleázy***

# Co to jsou restriční endonukleázy

Enzymy, které štěpí dsDNA ve specifických místech, specifických sekvencích

- součást **restričně modifikačních** systémů bakterií
- omezují propagaci bakteriofágů v různých bakteriálních kmenech
- DNA hostitelské buňky je před účinkem vlastní RE chráněna metylací
- původní význam RE: **ochrana** před cizorodým genetickým materiálem



# *Dělení restričních endonukleáz*

- Typ I** - rozpoznávají specifickou sekvenci, štěpí v nahodilém místě
- Typ II** - přísně specifické, rozpoznávají a štěpí sekvence s rotační symetrií (palindrom)
- Typ III** - rozpoznávají nesymetrické sekvence a štěpí v jiném místě v definované vzdálenosti
- Typ IV** - štěpí mimo rozpoznávanou sekvenci, která musí být modifikována

# *Restriktázy typu II*

## **Rozpoznávají palindromy a štěpí ve stejném místě**

- **vážou se na specifické (4-8 pb) sekvence nukleotidů**
- **katalyzují štěpení obou řetězců molekuly DNA uvnitř vazebného místa nebo v jeho bezprostředním sousedství**
- **štěpení se podrobují všechna cílová místa v dané molekule DNA**
- **molekulová hmotnost: 20 000 až 100 000**
- **kofaktor: pouze ATP**

# *Jak vypadá palindrom?*



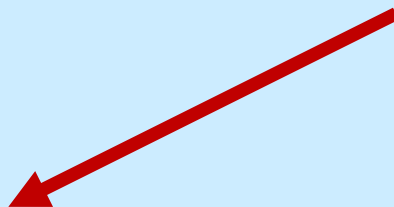
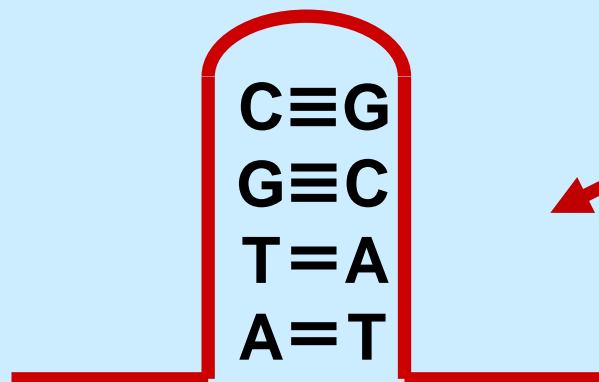
Přilehlá obrácená repetice

5' ..... **ATGC**/GCAT ..... 3'

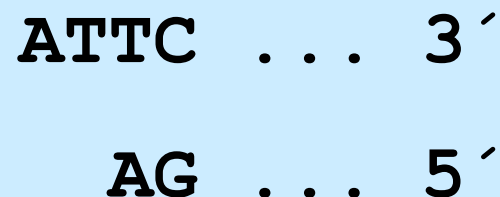
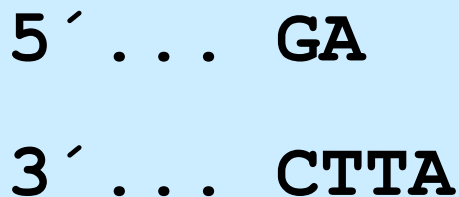
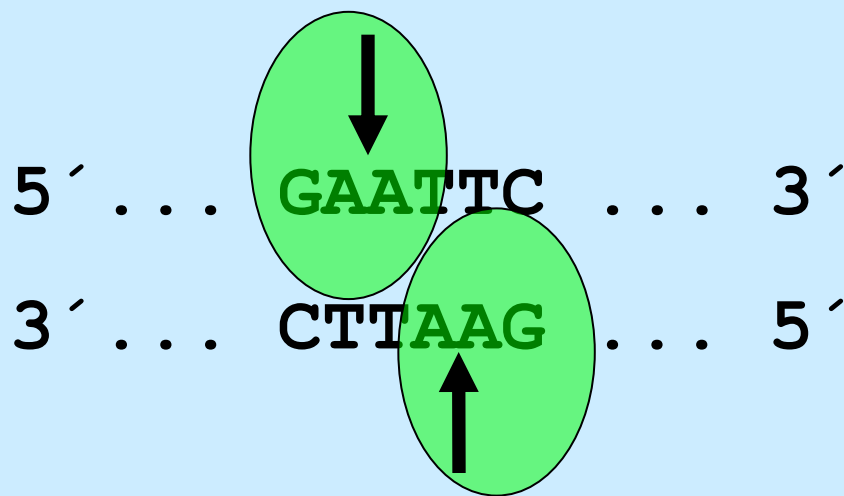
3' ..... TACG/**CGTA** ..... 5'

Vlášenka

ATGC GCAT



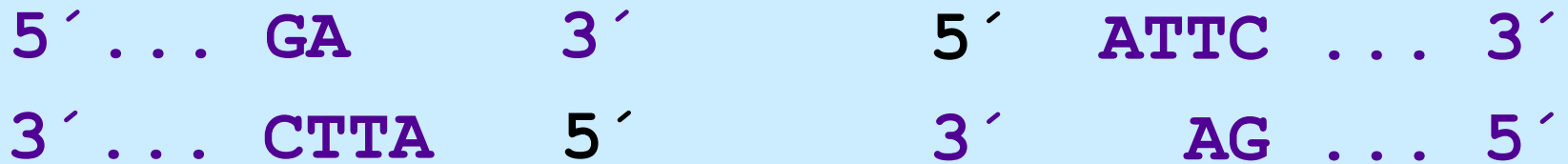
# *Jak funguje RE typu II*



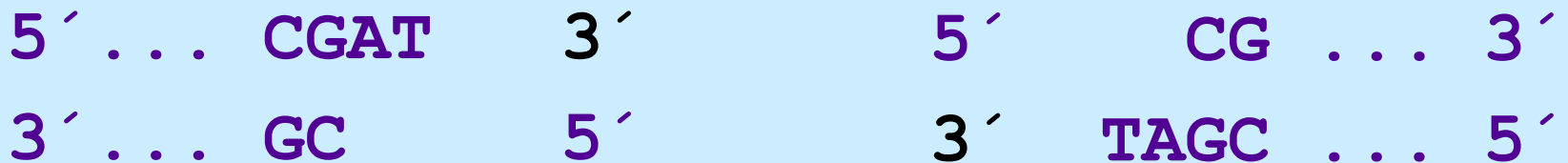
Je známo přes 3 500 RE, rozpoznávají asi 160 různých sekvencí

# Různé typy konců

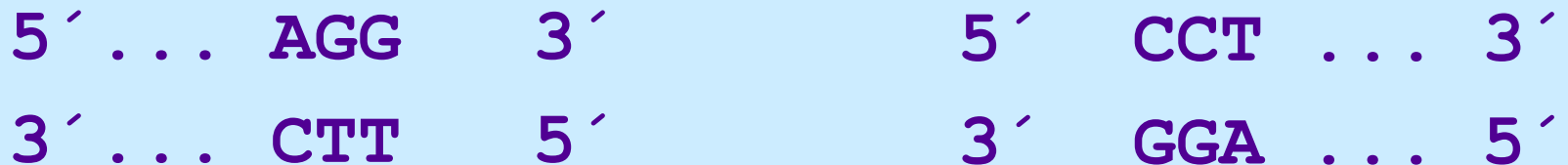
lepivé (kohezní) úseky přecházející na 5'- koncích, **EcoR I**



lepivé (kohezní) úseky přecházející na 3'- koncích, **Pvu II**



zarovnané (tupé) konce, **Stu I**





## Podívejte se na animace

<http://www.dnalc.org/ddnalc/resources/animations.html>



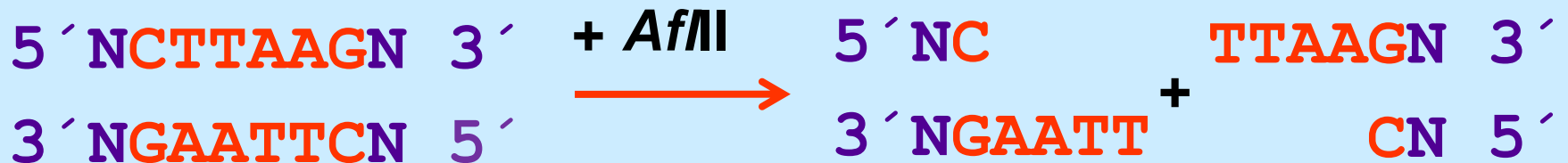
[http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student\\_view0/chapter16/animations.html](http://highered.mcgraw-hill.com/sites/0072437316/student_view0/chapter16/animations.html)



**Nebo si vyžádejte staženou prezentaci**

**Existuje i procvičovací pps soubor**

# Pro štěpení je důležitá orientace!



# *Relaxovaná specifčnost*

## Star activity

Některé restriktázy za určitých reakčních podmínek štěpí blízce příbuzné sekvence

*EcoRI*

5' ... G A A T T C ... 3'



5' ... G **G** A T T C ... 3'

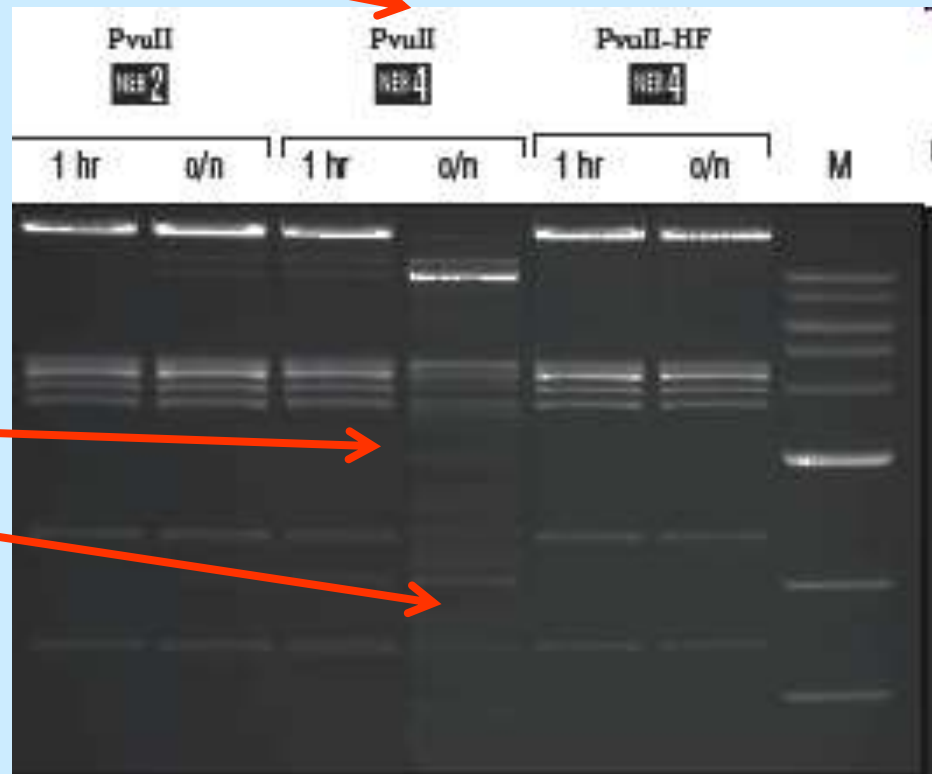
5' ... G **G** A T T **T** ... 3'

5' ... **A** **G** A T T **T** ... 3'

# *Důsledky relaxované specifičnosti*

- nesespecifické produkty
- často za neoptimálních reakčních podmínek

nerozštěpené  
fragmenty DNA

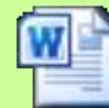


# Zkuste vypočítat



Jedna jednotka restriční endonukleázy *Bam*HI je množství enzymu, které rozštěpí 1  $\mu$ g DNA fága  $\lambda$  za optimálních reakčních podmínek při 37°C za 1 hodinu. Na molekule DNA fága  $\lambda$  je celkem 5 štěpných míst pro restriktázu *Bam*HI. Chceme-li linearizovat plasmid, který obsahuje jediné restriční místo pro tuto restriktázu, jaké podmínky štěpení použijeme? Máme linearizovat  $10^{10}$  molekul plasmidu.

Řešení je zde



Dokument  
ikace Microsoft W

# ***Názvosloví restričních endonukleáz***

např. **EcoRI**

- **1. písmeno:** počáteční písmeno **rodu** produkční bakterie
- **2. a 3. písmeno:** první dvě písmena **druhu** produkční bakterie
- označení **kmene (serotypu)** produkční bakterie (ne vždy)
- římská číslice vyjadřuje pořadové číslo endonukleázy izolované z dané bakterie

**Počet rozpoznávaných  
sekvencí pro určitou  
restrikční endonukleázu na  
DNA o známé délce můžeme  
vypočítat**



# ***Jak často se vyskytuje čtveřice?***

**Předpokládáme, že ....**

- **máme nekonečně dlouhou molekulu**
- **sekvence nukleotidů je naprosto nahodilá**

**Máme 4 nukleotidy a děláme z nich čtveřice**

$$**4^4 = 256 bp**$$



# ***Restriktázy štěpí nejčastěji čtveřice nebo šestice nukleotidů***

**Jaká je frekvence výskytu štěpícího místa pro  
restriktázu *EcoR* I (štěpí sekvenci GAATTC) ?**

**Frekvence výskytu štěpícího místa pro  
restriktázu *EcoR* I je 1 ku  $4^6$**

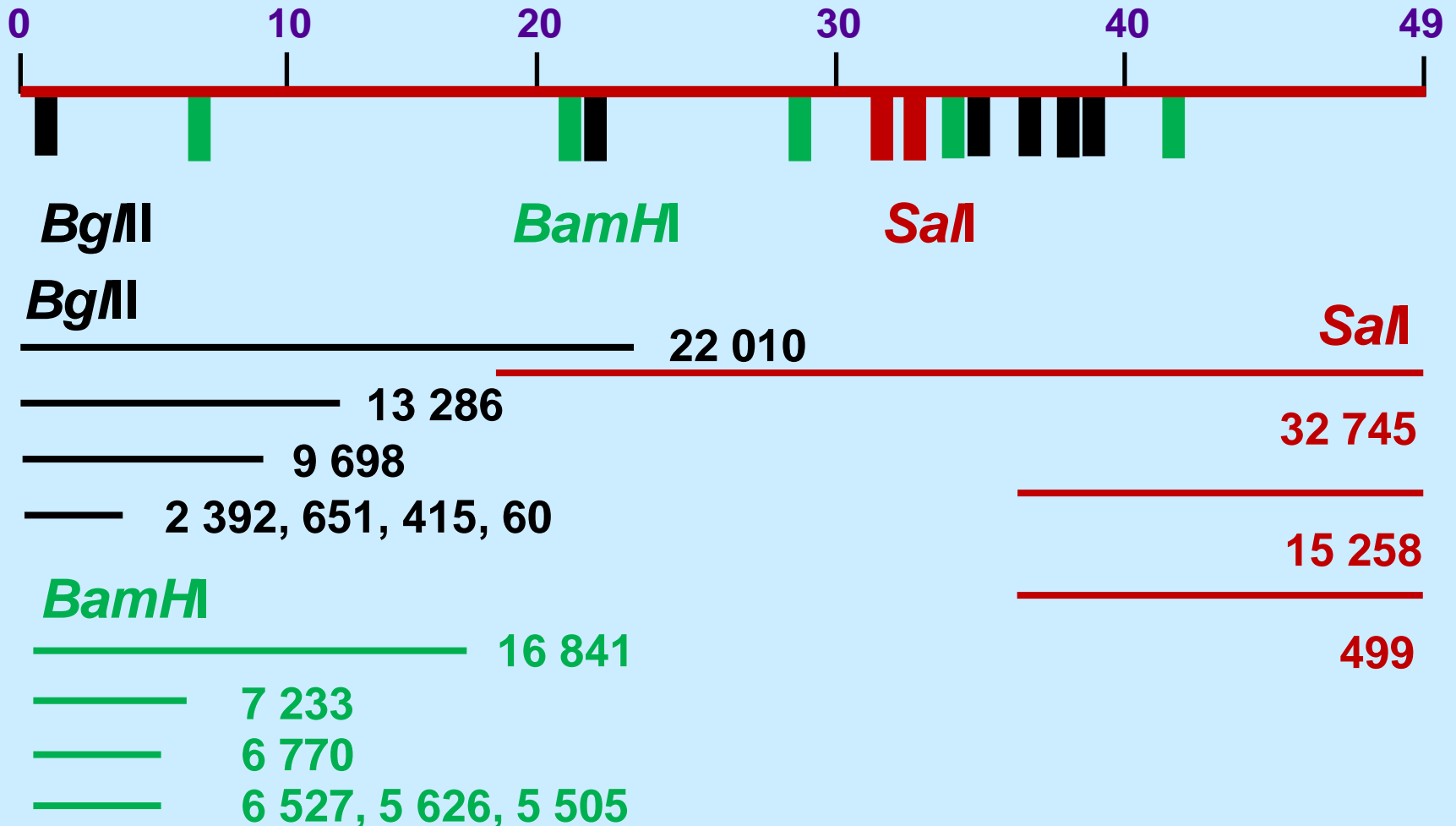
$$4^6 = 4\ 096 \text{ (bp)}$$

**Šedivá je teorie a zelený  
strom života**



# Reálná situace

DNA fága  $\lambda$   $\rightarrow$  49 kbp  $\rightarrow$  12 míst pro RE štěpící hexamery



# Počet restričních míst pro daný enzym v molekule DNA klesá s jejich velikostí

| DNA source                | Genome size (kb) | Number of restriction sites |        |       |
|---------------------------|------------------|-----------------------------|--------|-------|
|                           |                  | 4bp                         | 6bp    | 8bp   |
| 1 pUC19                   | 3                | 10                          | 0-1    | 0-1   |
| 2 SV40                    | 5                | 20                          | 1      | 0-1   |
| 3 Bacteriophage $\lambda$ | 48               | 190                         | 12     | 0-1   |
| 4 Bacteriophage T4        | 165              | 660                         | 40     | 2-3   |
| 5 Bacteria                | 4700             | 18400                       | 1100   | 70    |
| 6 Yeast*                  | 16000            | 62500                       | 3900   | 250   |
| 7 Fruit fly*              | 120000           | 470000                      | 30000  | 1800  |
| 8 Mammals*                | 3000000          | 11700000                    | 730000 | 46000 |

\* Haploid values (most somatic cells have twice as much DNA)

# *Homing endonucleases*

Nukleázy, které štěpí dsDNA a rozpoznávají dlouhé nesymetrické sekvence (12-40 nukleotidů) a kódující sekvence intronů a inteinů

- Názvosloví jako u restriktáz s prefixem I- nebo PI-
- Štěpí s extrémně nízkou četností
- Nejsou příliš specifické, proto je průměrná frekvence štěpení jako by rozpoznávaly 10-12 bp

**I-CeuI, I-SceI, PI-PspI**

# Vypočítejte



Jestliže je počet nukleotidů v diploidním genomu člověka roven přibližně 3 miliardy párů bází, jaká je nejmenší délka sekvence, která se v takovém genomu bude vyskytovat pouze jedenkrát?

Řešení je zde

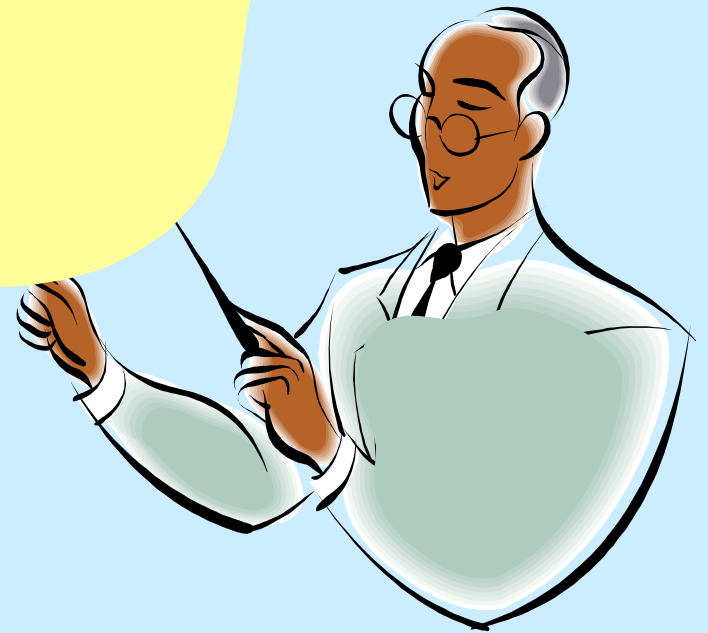


Dokument  
ikace Microsoft W

# ***Význam restrikčních endonukleáz***

- nástroj pro přípravu rekombinantních molekul DNA
- prostředek pro studium struktury, organizace, exprese a evoluce genomu
- základ pro genové inženýrství
- fyzikální mapování DNA
- analýza populačních polymorfizmů
- změny v uspořádání molekul DNA
- příprava molekulárních sond
- příprava mutantů
- analýza modifikací DNA

**Mnoho dalších informací k  
restriktázám najdete na  
<http://rebase.neb.com/rebase/>**





# *Rozřezání genomu endonukleázami*



**dsDNA**



**Restrikční fragmenty**

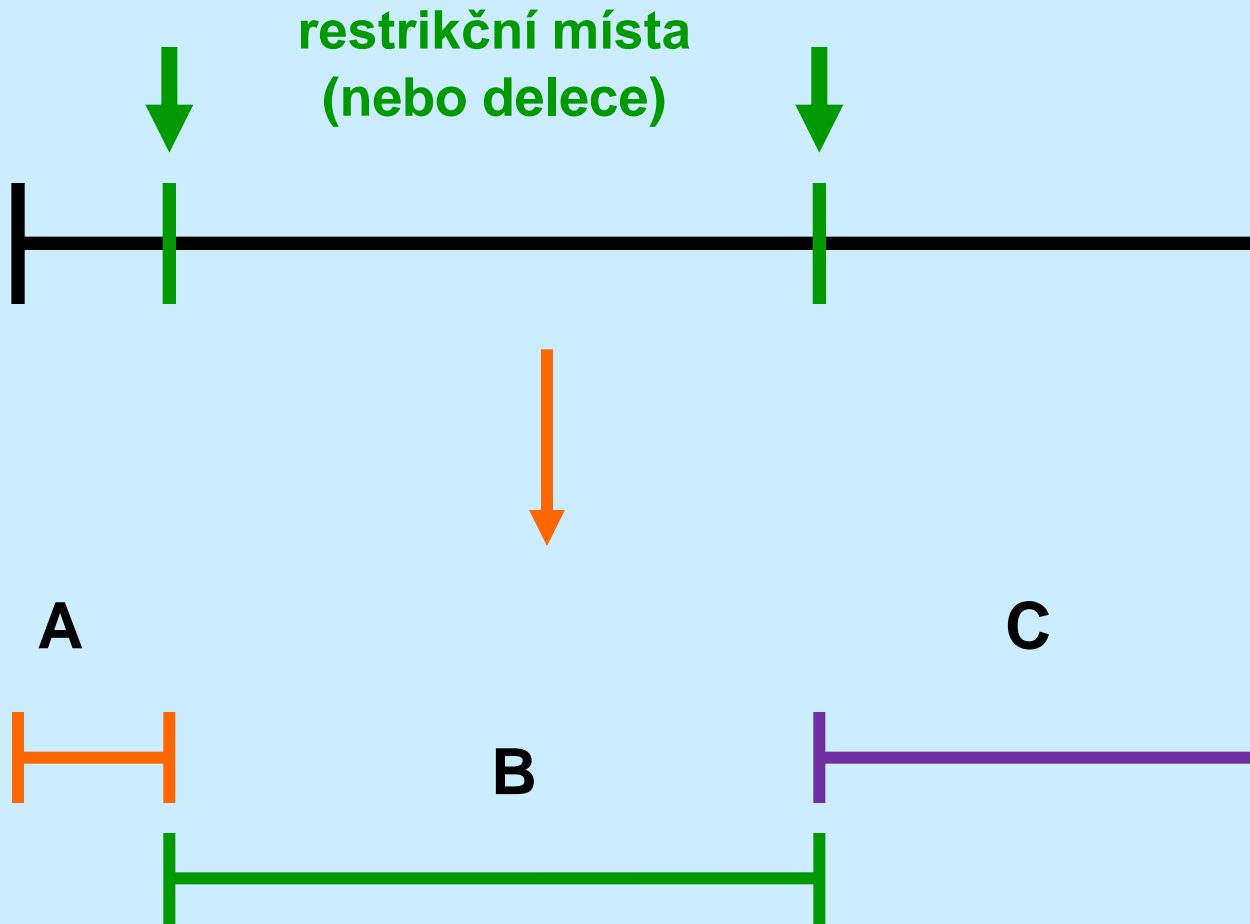
***Fragmenty vzniklé restriční  
štěpením lze rozdělit  
elektroforézou***

- 1) Velikost jednotlivých fragmentů můžeme stanovit elektroforézou**
- 2) Jednotlivé fragmenty můžeme poskládat a vytvořit tzv. restrikční mapu**



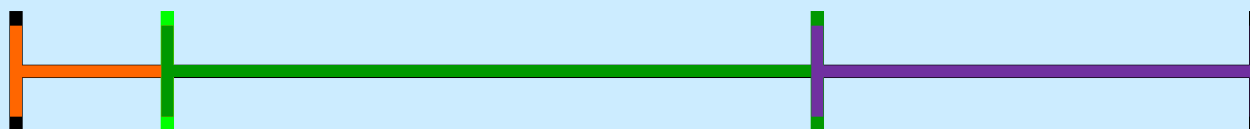
# ***Skládání restriční mapy***

# *Restrikční štěpení lokusu*



# *Získané fragmenty lze uspořádat více způsoby*

**Původní pořadí = A-B-C**



**Další možnosti**

**A-C-B**



**C-A-B**



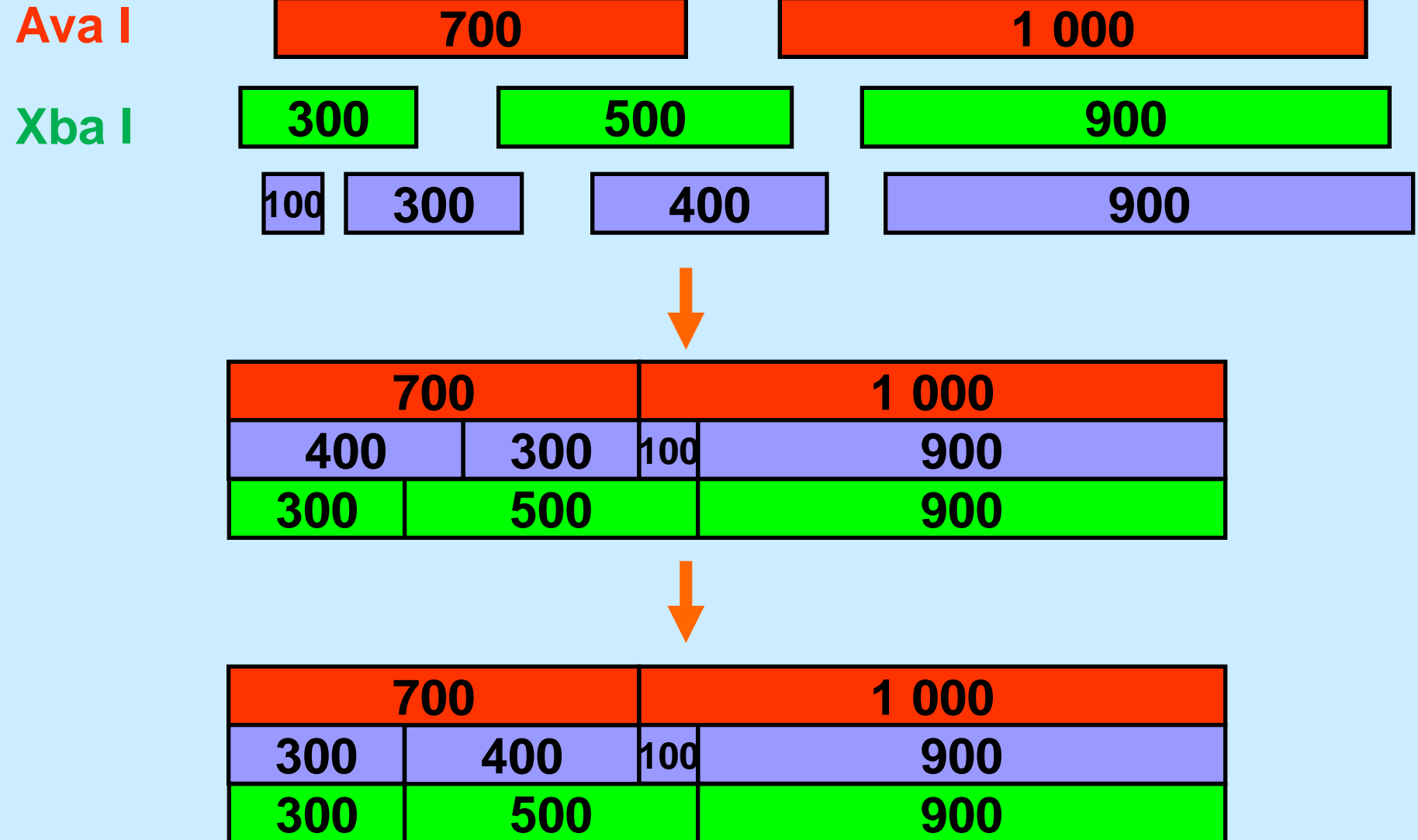
**C-B-A**



# ***Mapy se skládají po štěpení více restriktázami***

- **po štěpení restriktázou Xba I jste získali fragmenty o velikosti 300, 500 a 900 bp**
- **po štěpení restriktázou Ava I fragmenty o velikosti 700 a 1 000 bp**
- **po štěpení oběma restriktázami současně fragmenty o velikosti 100, 300, 400 a 900 bp**

# Mapy se skládají po štěpení více restriktázami



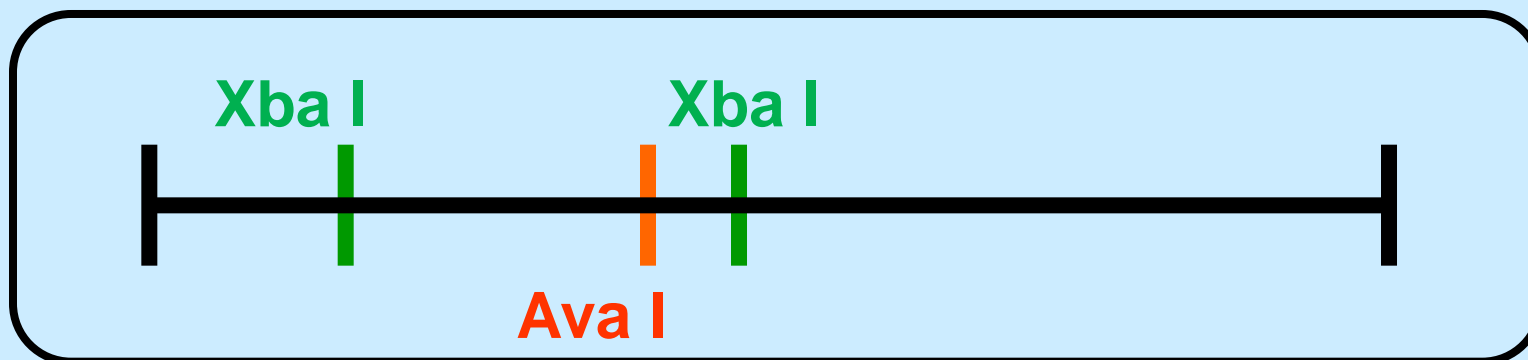


# Výsledná mapa

Ava I

|     |     |       |     |
|-----|-----|-------|-----|
| 700 |     | 1 000 |     |
| 300 | 400 | 100   | 900 |
| 300 | 500 | 900   |     |

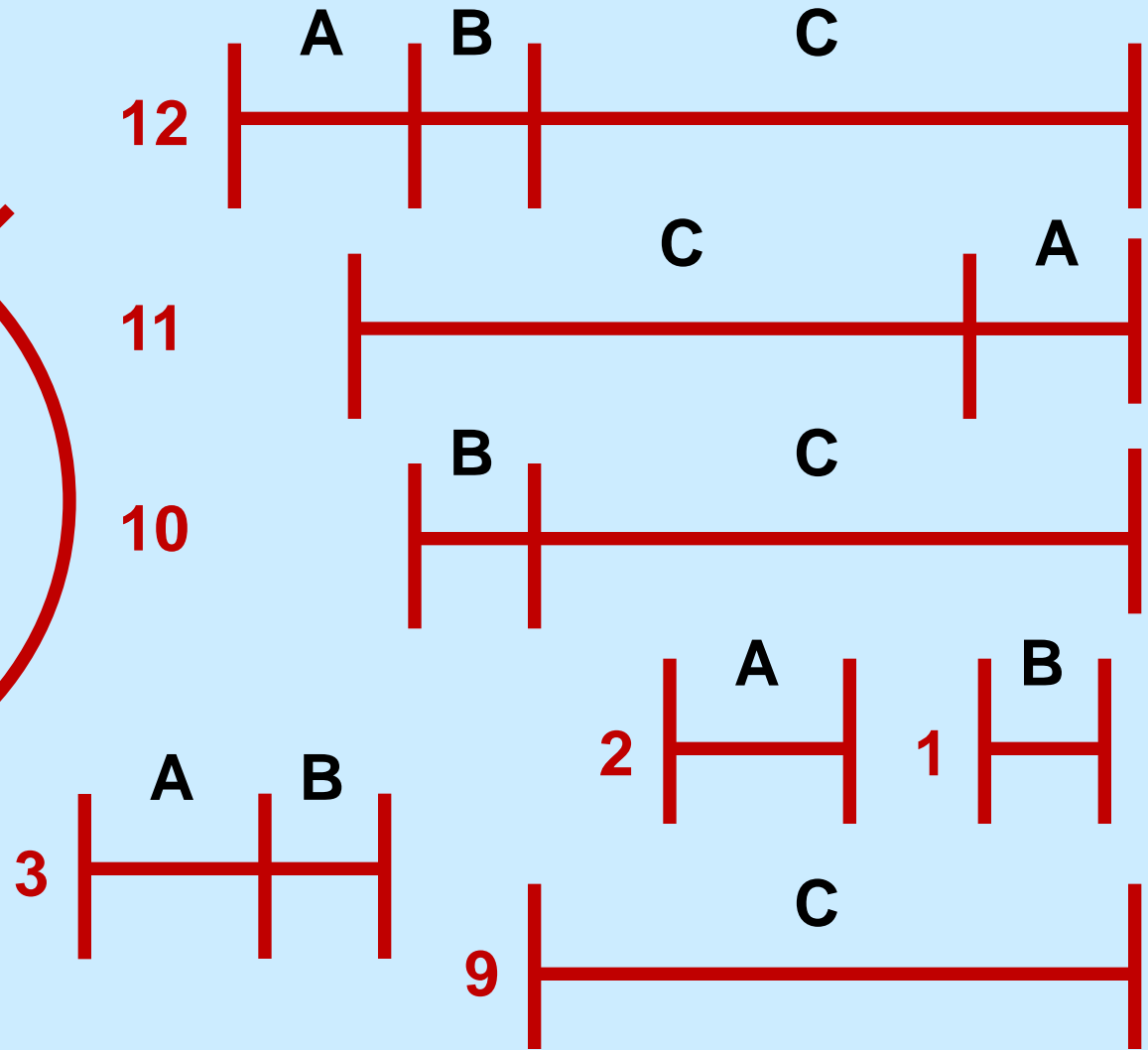
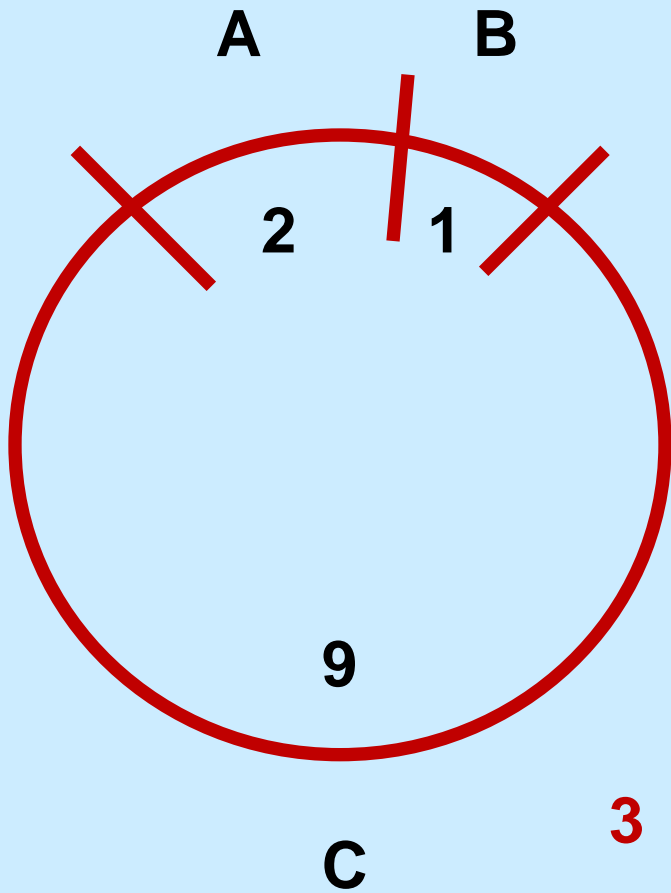
Xba I



|     |     |       |     |
|-----|-----|-------|-----|
| 300 | 500 | 900   |     |
| 300 | 400 | 100   | 900 |
| 700 |     | 1 000 |     |

***Vytvoření restriční mapy  
po parciálním štěpení***

# Co je to parciální štěpení



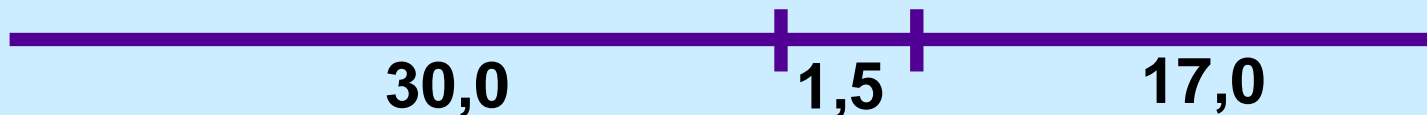
# ***Příklad parciálního štěpení***

- 1) Po částečném štěpení DNA bakteriofága  $\lambda$  restrikázou *KpnI* jste získali fragmenty o velikosti 1,5; 17,0; 18,5; 30,0; 31,5 a 48,5 kbp.
- 2) Úplným štěpením jste získali fragmenty 1,5; 17,0 a 30,0 kbp.
- 3) Sestavte restrikční mapu.

Z daných výsledků lze odvodit

- 1) Fragment 48,5 odpovídá neštěpené molekule fága
- 2) Fragmenty 1,5; 17,0; a 30,0 jsou produkty kompletního štěpení
- 3) Fragmenty 18,5 a 31,5 kbp jsou produkty částečného štěpení

**Restrikční mapa pro *KpnI* musí být**



# A teď si to ještě procvičte



Jestliže z předchozího příkladu znáte restriční mapu pro *KpnI*, pak vytvořte restriční mapu pro *KpnI*, *XbaI* a *XhoI* podle výsledků shrnutých v tabulce

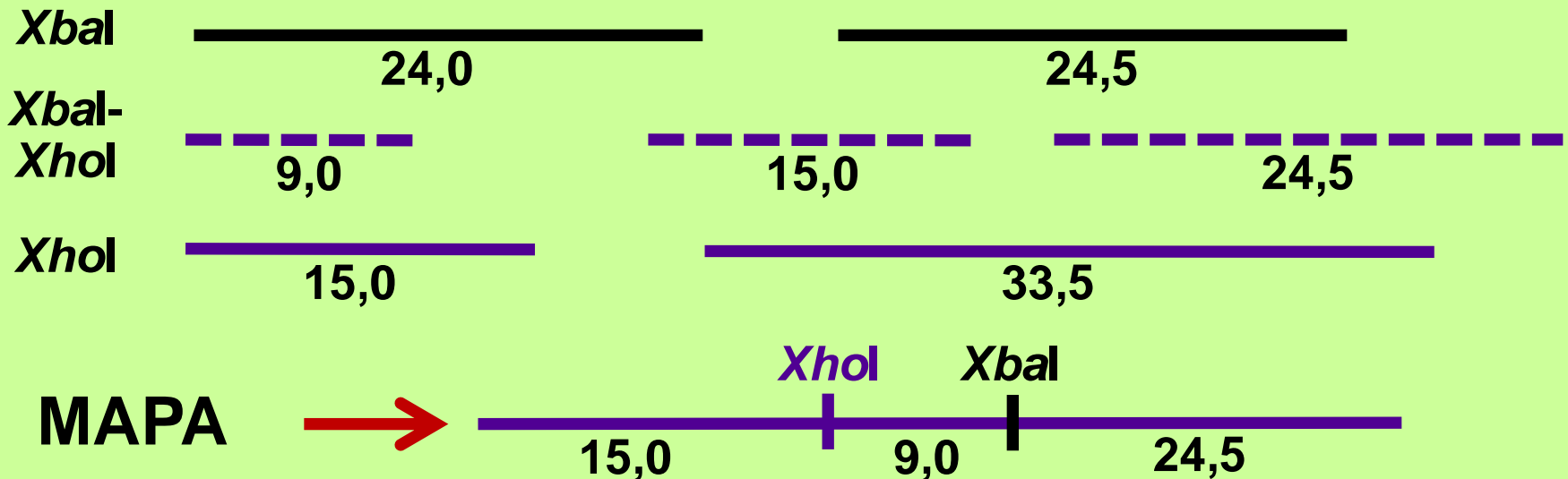
| Enzym                     | Počet fragmentů | Velikosti (kbp)      |
|---------------------------|-----------------|----------------------|
| <i>XbaI</i>               | 2               | 24,0; 24,5           |
| <i>XhoI</i>               | 2               | 15,0; 33,5           |
| <i>KpnI</i>               | 3               | 1,5; 17,0; 30,0      |
| <i>XbaI</i> + <i>XhoI</i> | 3               | 9,0; 15,0; 24,5      |
| <i>XbaI</i> + <i>KpnI</i> | 4               | 1,5; 6,0; 17,0; 24,0 |

# Postup řešení



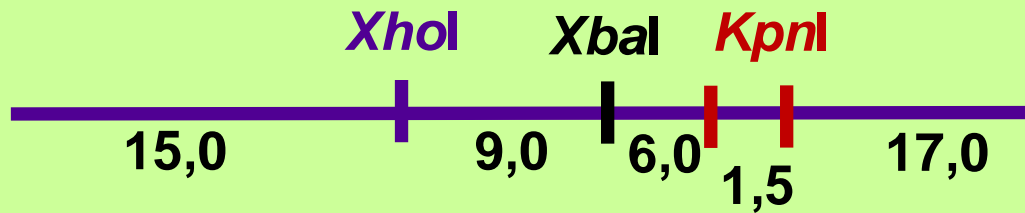
1) DNA fága  $\lambda$  je lineární, proto jsou počty restričních míst pro jednotlivé restriktázy rovny:  $XbaI = 1$ ,  $XhoI = 1$ ,  $KpnI = 2$

2) Fragmenty pro  $XbaI$  a  $XhoI$  jsou následující:



3) Všechna místa pro  $KpnI$  jsou ve fragmentu  $XbaI$  (24,5), protože se tento fragment po štěpení  $XbaI-KpnI$  neštěpí. Pořadí míst  $KpnI$  je určeno z částečného štěpení.

# Výsledná mapa



# ***Využití restriktáz a PCR – detekce polymorfismů v genomech mikroorganismů***

- **Krátké fragmenty = RFLP – polymorfismus délky restričních fragmentů**
- **Dlouhé fragmenty = PFGE – pulsní gelová elektroforéza**
- **Analýza produktů PCR = PCR-REA**
- **Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů = AFLP**
- **Polymorfismy konformace SSCP, DSCP**



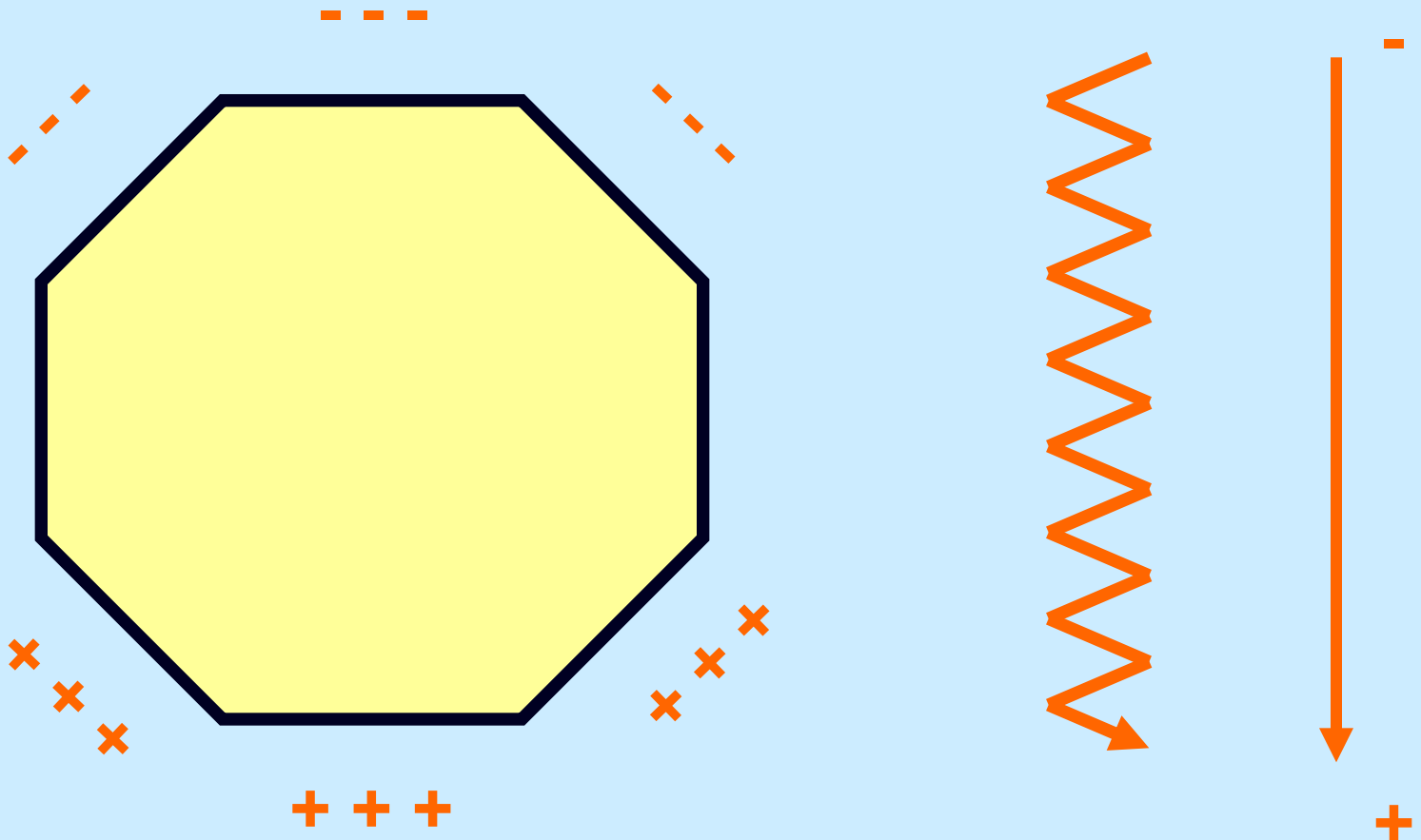
# ***RFLP = polymorfismus délky restrikčních fragmentů***

**Tuto část probereme v rámci  
přednášky o hybridizaci**



# ***PFGE Pulsní gelová elektroforéza***

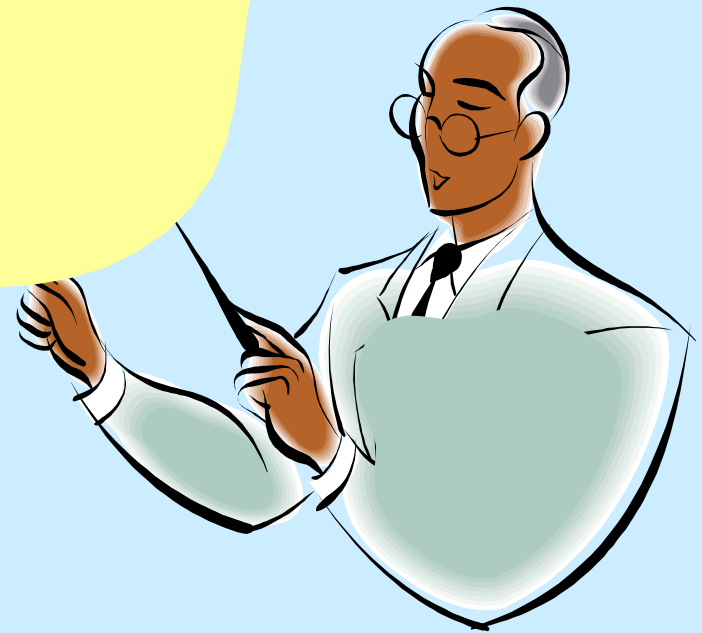
- určena k dělení velkých fragmentů DNA a chromozómů (nad 50 kbp, stovky kbp, megabáze)



# *Aparatura na PFGE*

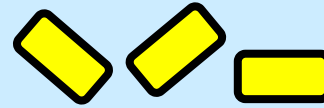


**Pěkná animace znázorňující pohyb  
DNA v pulsním poli je na  
[http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/pulse\\_field.html](http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/pulse_field.html)**

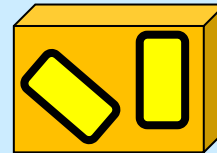


# ***Jak se provádí PFGE***

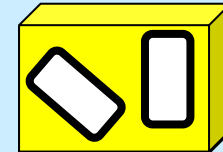
1) Buňky se naředí na vhodnou koncentraci



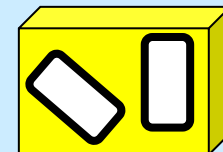
2) Buňky se zalijí do agarózy



3) Agarózové bločky se opracují enzymy – lyze, deproteinace

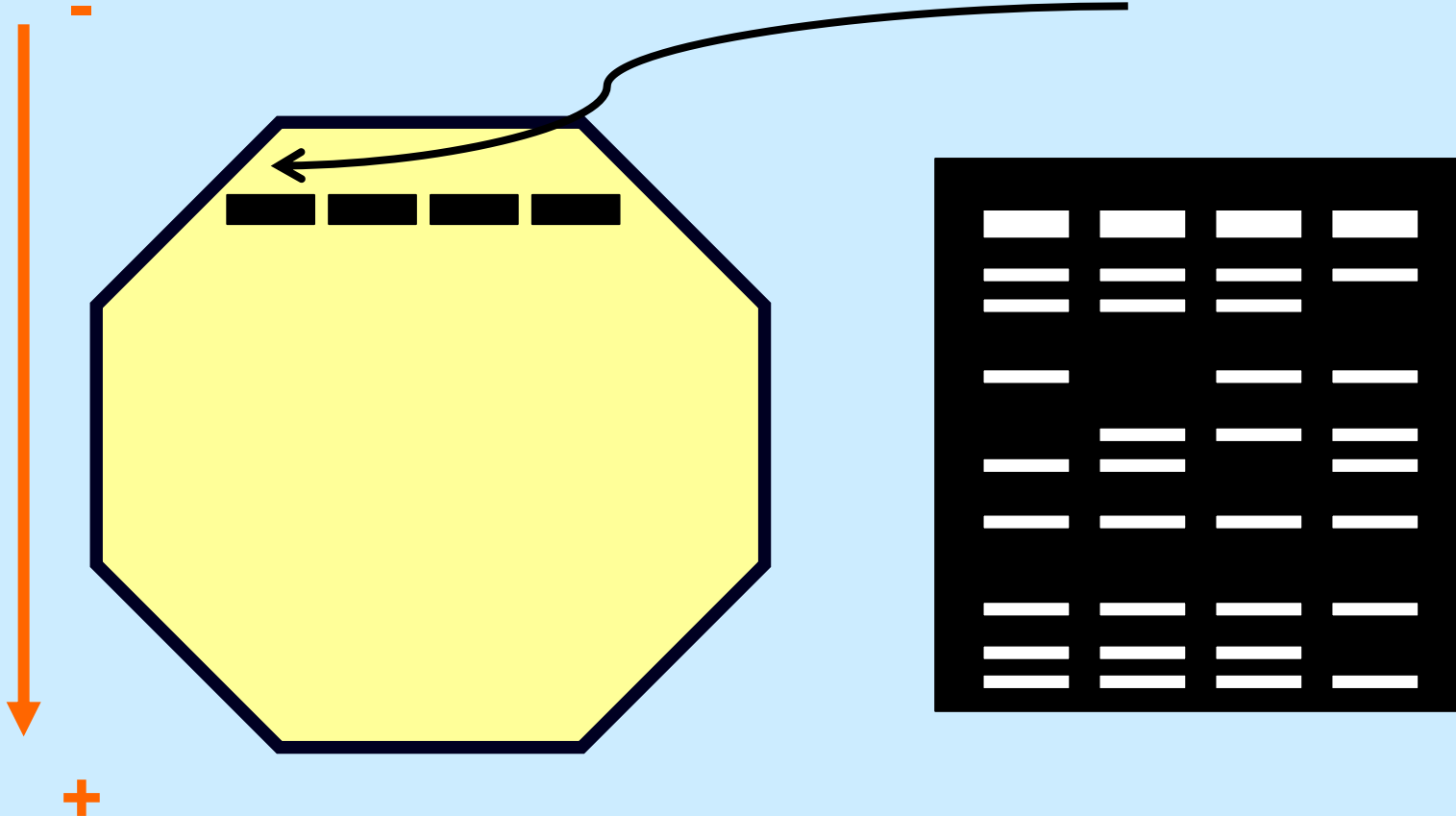
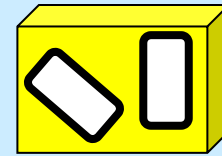


4) Na genomovou DNA v bločcích se aplikují restriktázy



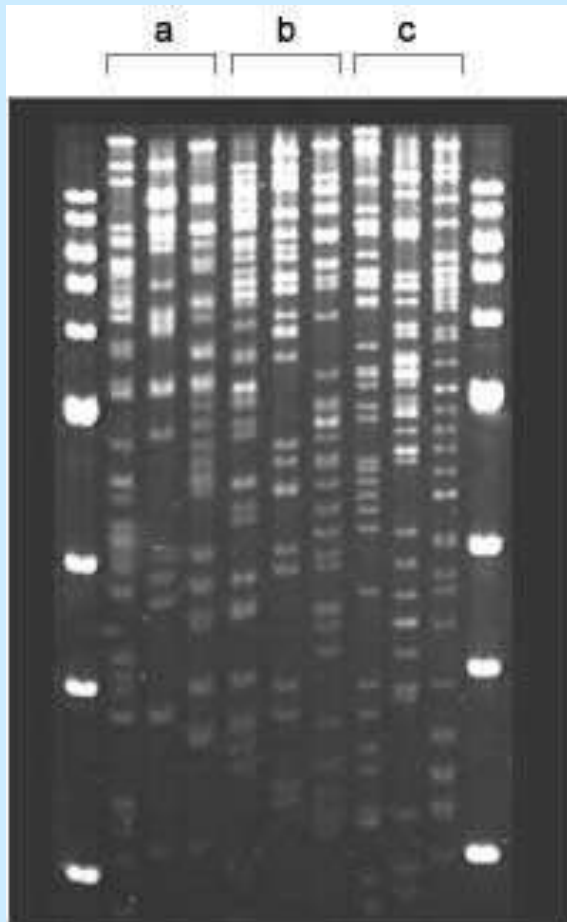
# ***Jak se provádí PFGE***

5) Bločky s rozštěpenou genomovou DNA se nanesou na elektroforézu



# ***Příklad aplikace PFGE***

**Diferenciace mykobakterií po štěpení *NotI***

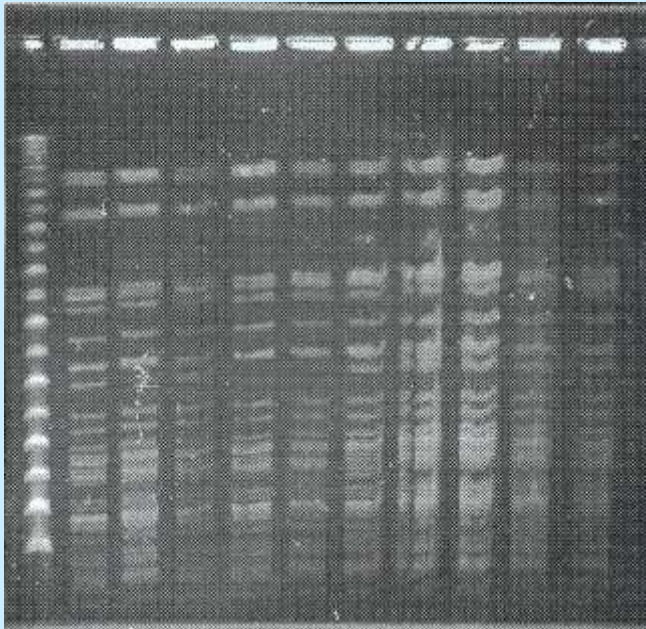


- nástroj pro epidemiology a epizootology
- stanovení fylogenetické příbuznosti
- nezbytná počítačová analýza dat

**! porovnej s RFLP !**

# ***Jiný příklad aplikace PFGE***

**Diferenciace *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* po štěpení *SnaBI*, *SpeI***



- **Pokus odlišit RFLP typy B-C1**

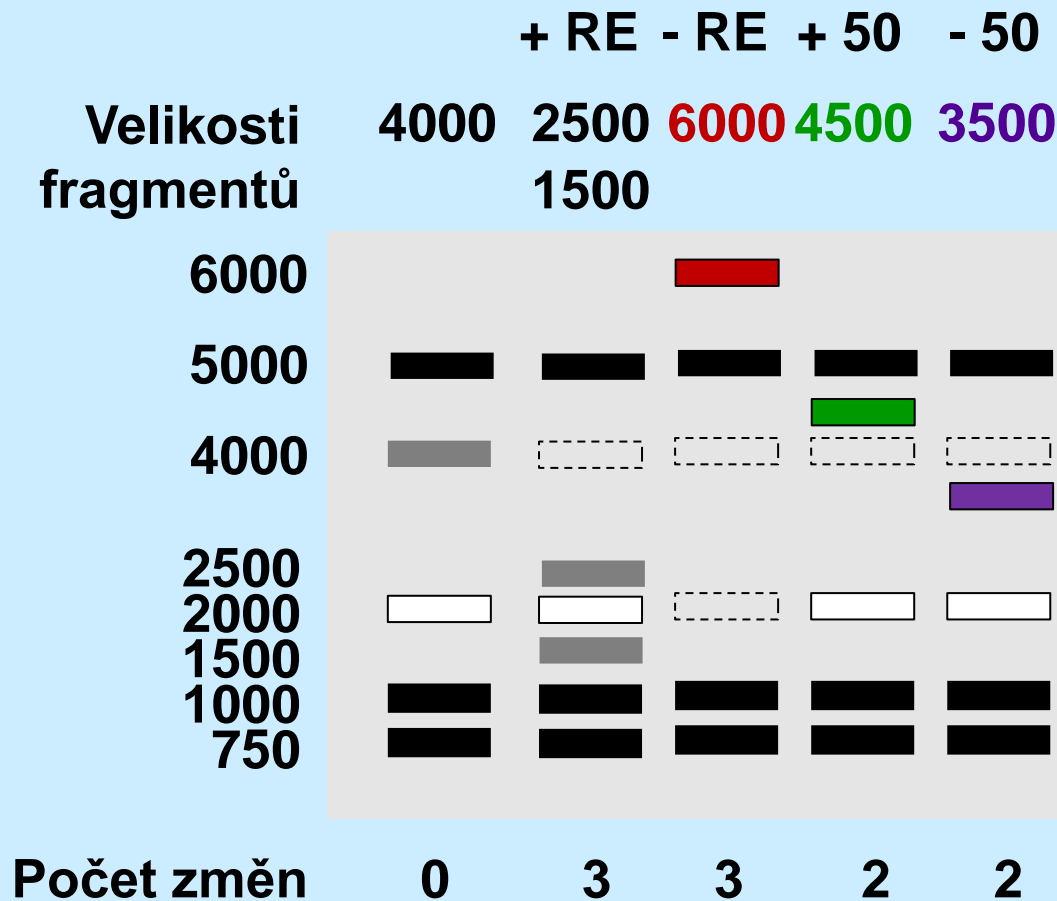
**Diferenciace *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* po štěpení *XbaI*, *DraI***

- **Studium genetické diversity kmenů izolovaných u pacientů s AIDS**



# Jak se vyhodnocují fragmenty získané po PFGE?

Analýza změn ve fragmentu 4 000 bp



# *Vliv mutace na RFLP spektrum*

## **Mutace**

## **Výsledek**

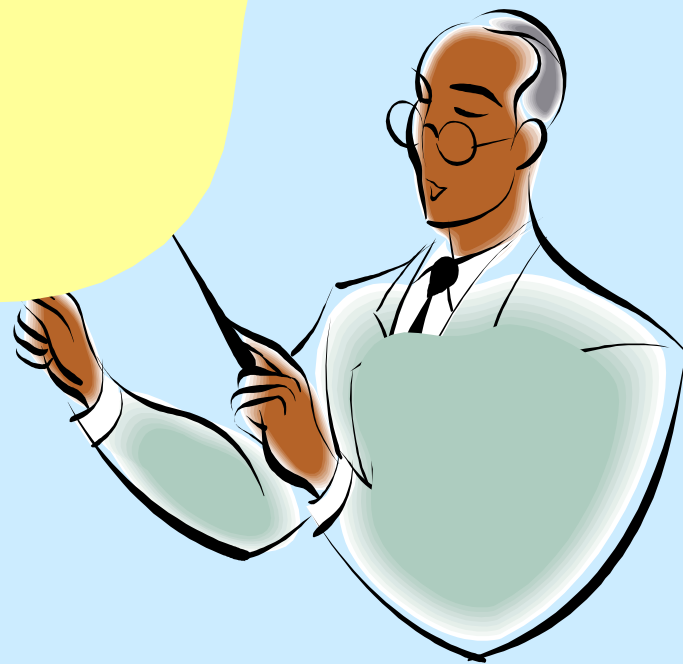
- **bodová +RE**
  - **bodová -RE**
  - **inzerce**
  - **delece**
- **ztráta fragmentu + 2 nové**
  - **ztráta 2 fragmentů + 1 větší nový**
  - **stejný počet fragmentů, ale jeden se „prodlouží“ o délku inzerce**
  - **stejný počet fragmentů, ale jeden se „zkrátí“ o délku delece**

# *Kritéria pro epidemiologii*

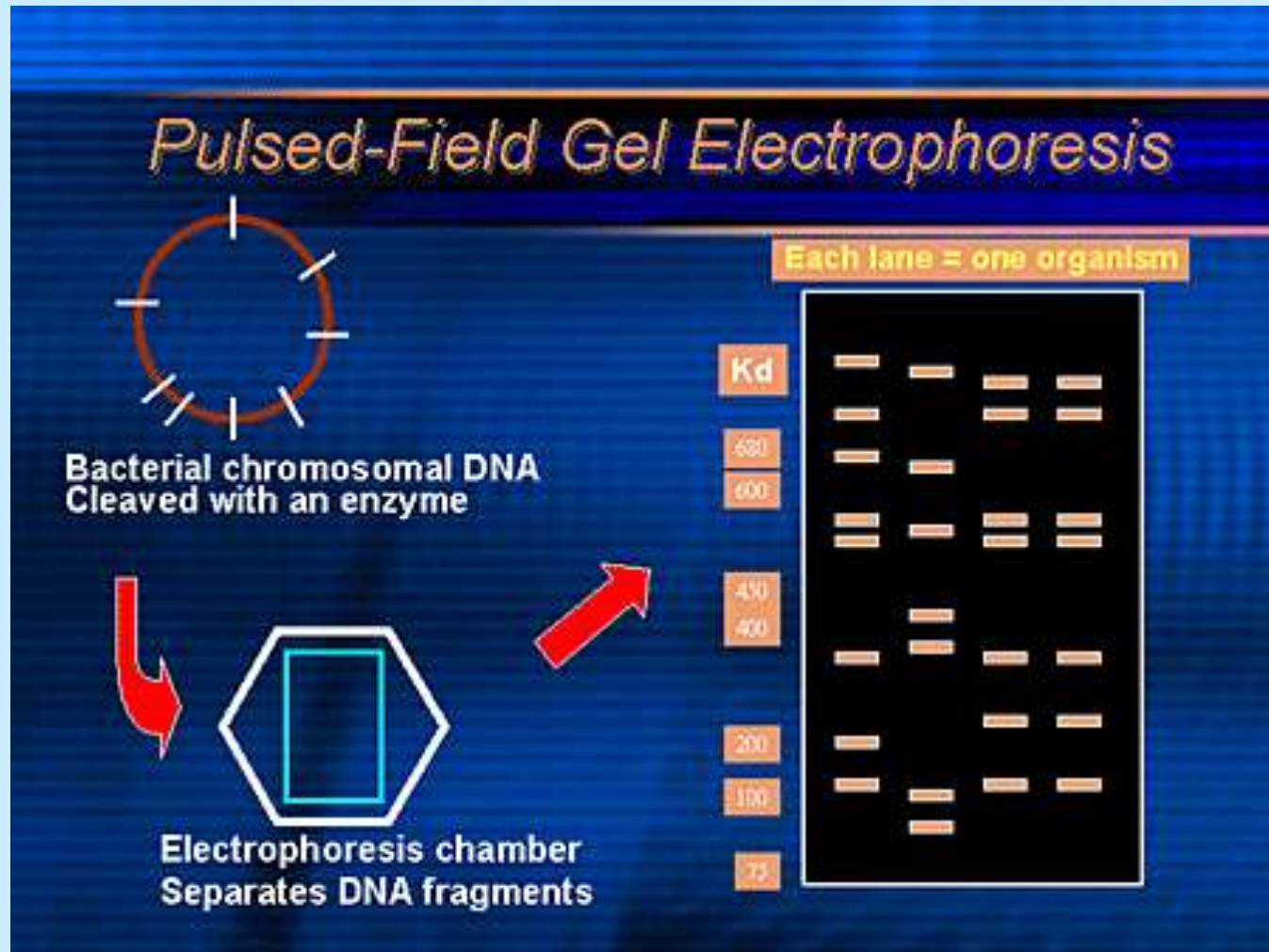
| Kategorie       | Počet genetických změn | Počet změn v PFGE | Epidemiologie                            |
|-----------------|------------------------|-------------------|--|
| Neodlišitelné   | 0                      | 0                 | Součást ohniska                          |
| Blízce příbuzné | 1                      | 2-3               | Pravděpodobně (probably) součást ohniska |
| Asi příbuzné    | 2                      | 4-6               | Možná (possibly) součást ohniska         |
| Odlišné         | ≥ 3                    | ≥ 7               | Mimo ohnisko                             |

Tenover et al. (1995): Journal of Clinical Microbiology 33 (9), 2233-2239

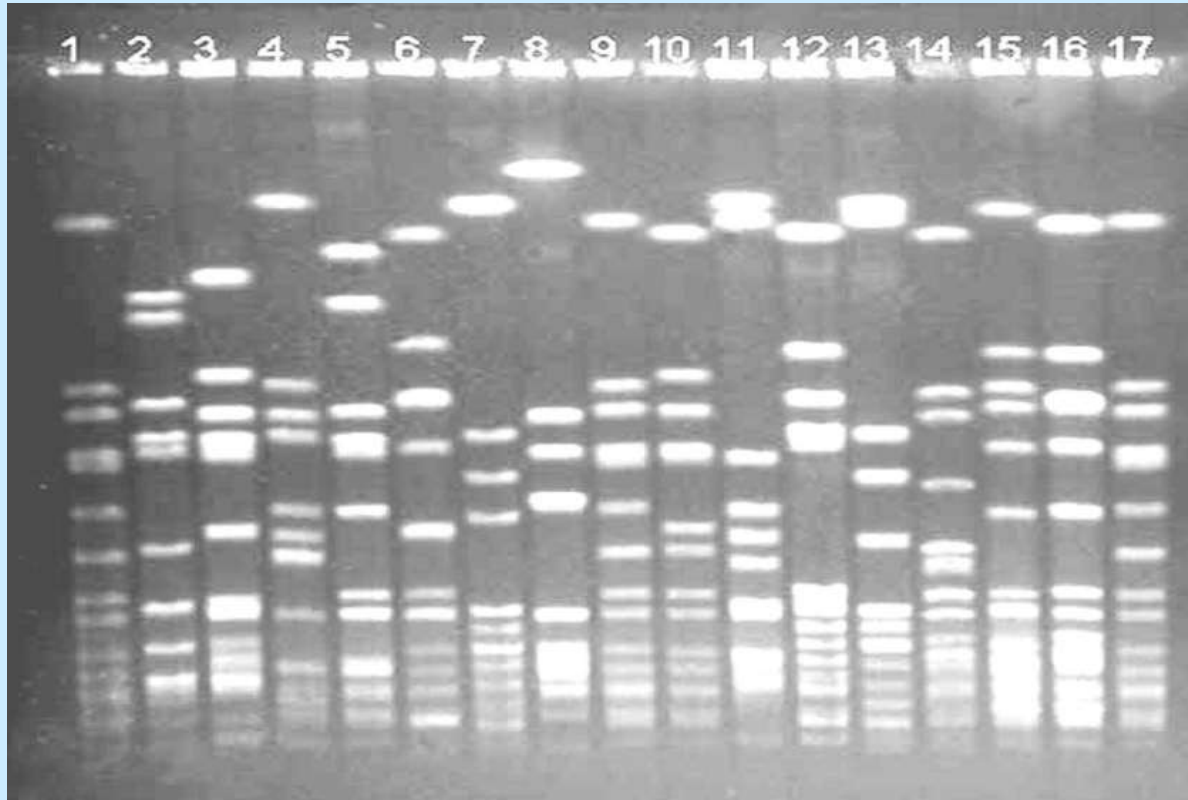
**Stejná pravidla platí pro RFLP**



# Analýza methicilin rezistentních *S. aureus* pomocí PFGE



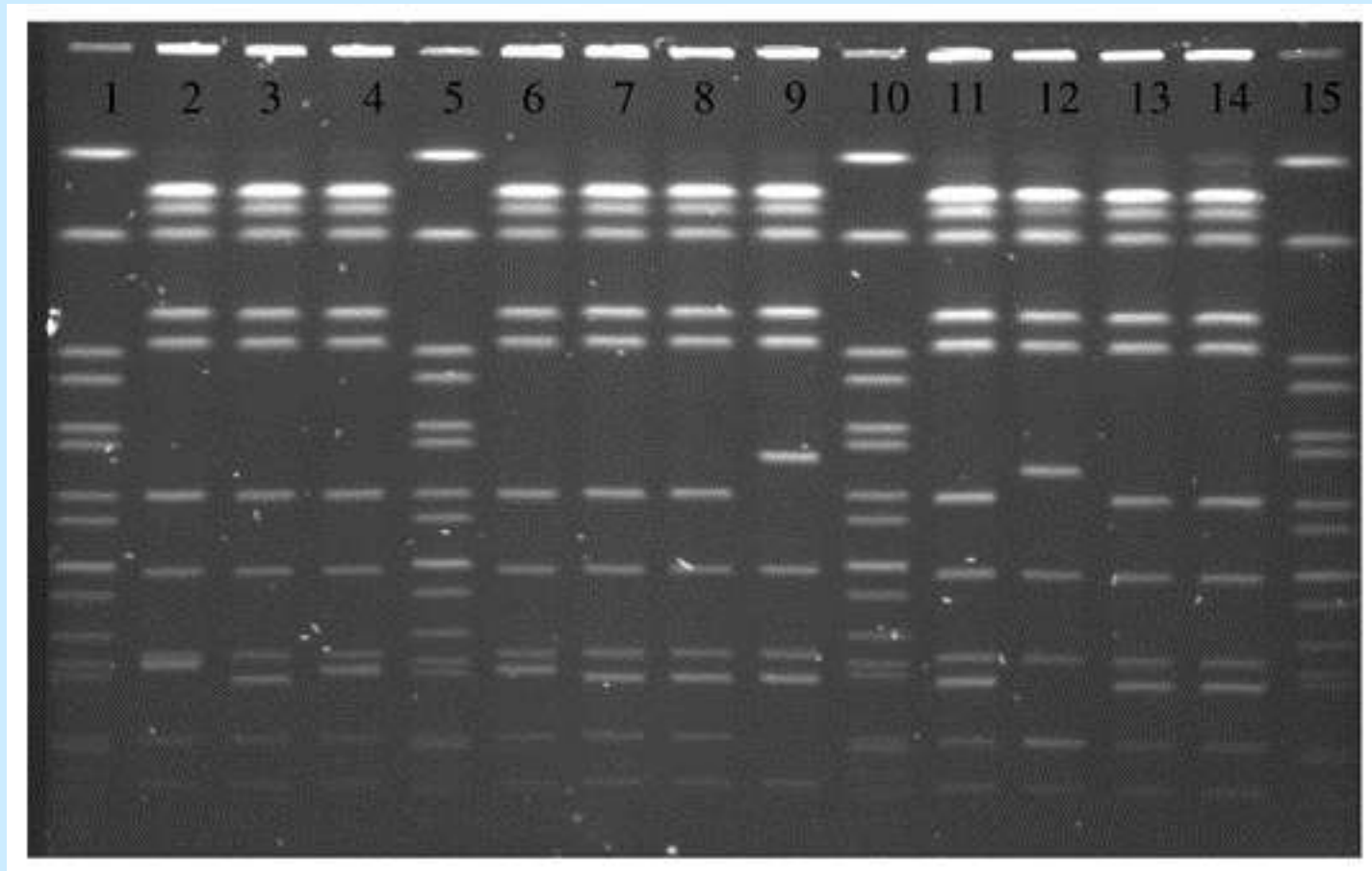
# Příklad PFGE pro MRSA



## Štěpení restriktázou *Sma*I

Dar et al. (2006): Molecular epidemiology of clinical and carrier strains of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the hospital settings of north India. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 5:22

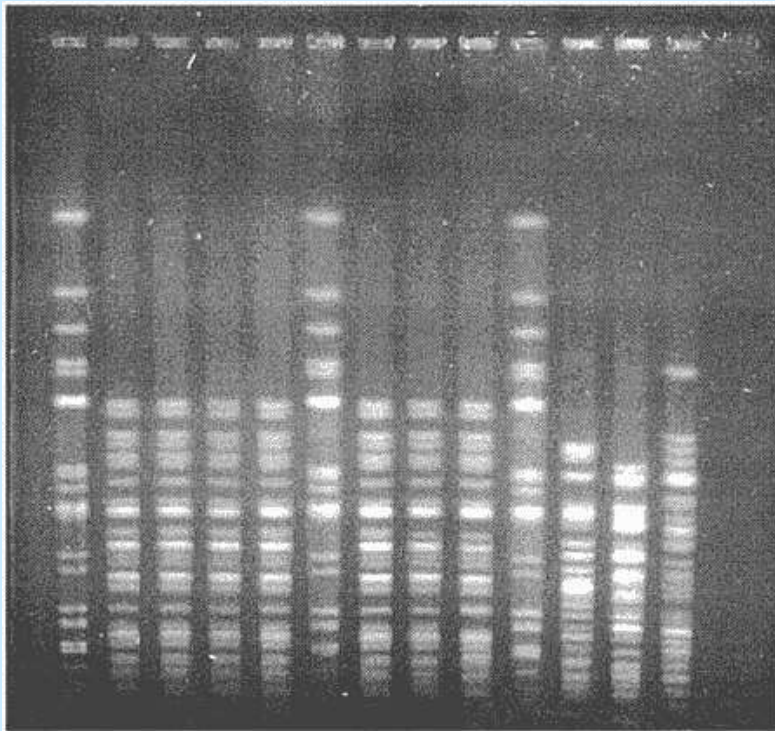
# Typizace salmonel pomocí PFGE



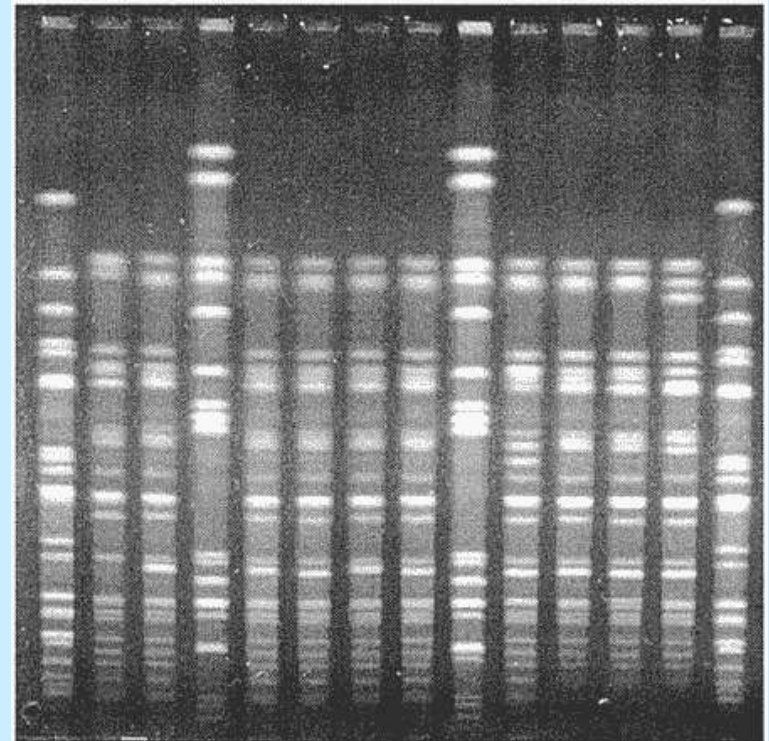
## Štěpení restriktázou *BlnI*

De Lappe et al. (2009): Role of subtyping in detecting Salmonella cross contamination in the laboratory. BMC Microbiology 9: 115

# *Shigella flexneri* a *Shigella sonnei*



Štěpení restriktázou *BlnI*

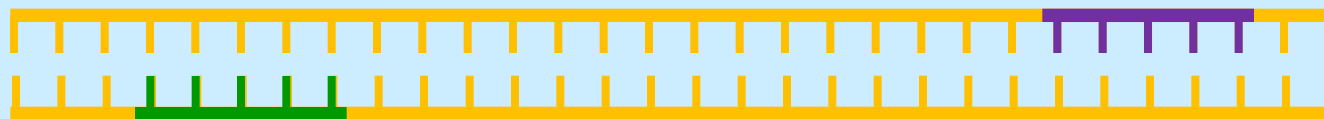


Štěpení restriktázou *XbaI*

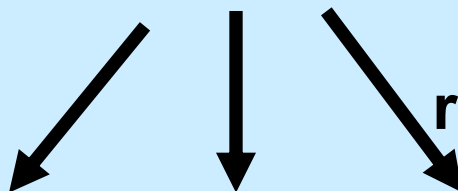
Kolektiv (2005): Outbreak of *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* enterocolitis in men who have sex with men, Quebec, 1999 to 2001. CCDR 31-08



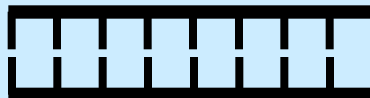
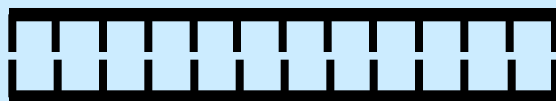
# PCR-REA, PRA, PCR-RFLP



**amplifikace**



**restrikční štěpení**



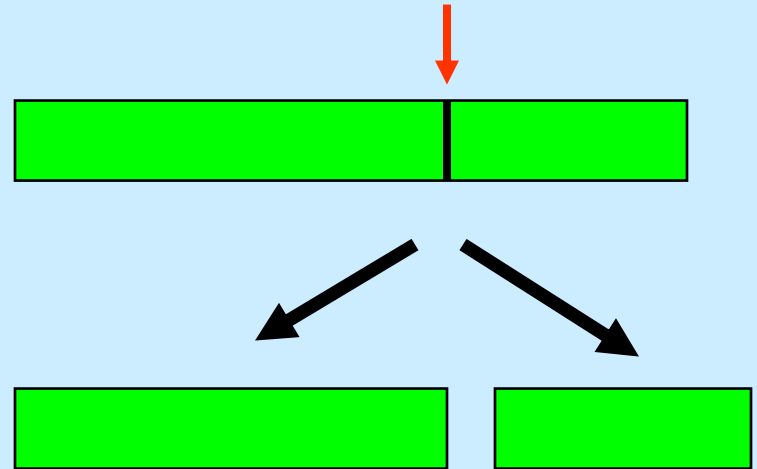
# *Bodová mutace u PCR-REA*

- 1) Amplifikace specifické DNA sekvence
- 2) Štěpení restriktázou



bez štěpení

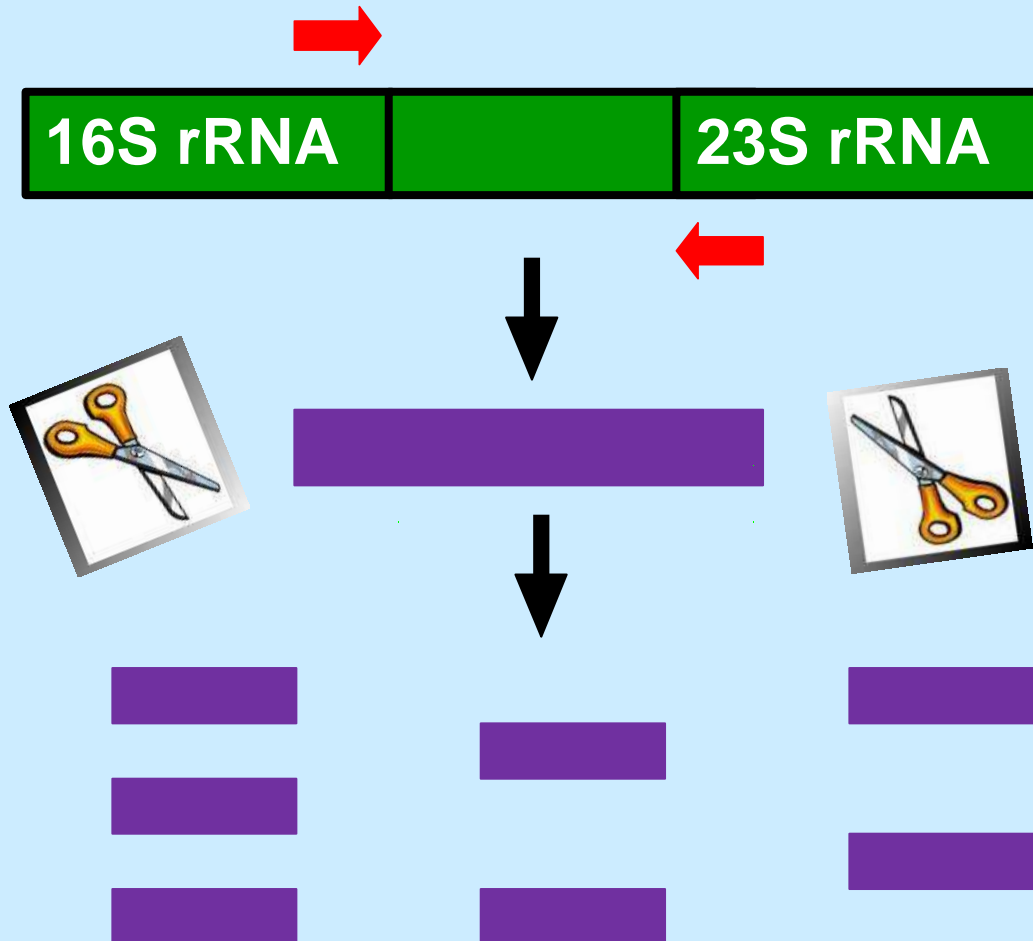
bodová mutace



# ***Příklady aplikací PCR-REA***

# *Diferenciácie zástupců rodu Mycobacterium*

16S-rRNA, mezerník 16S-23S-rRNA

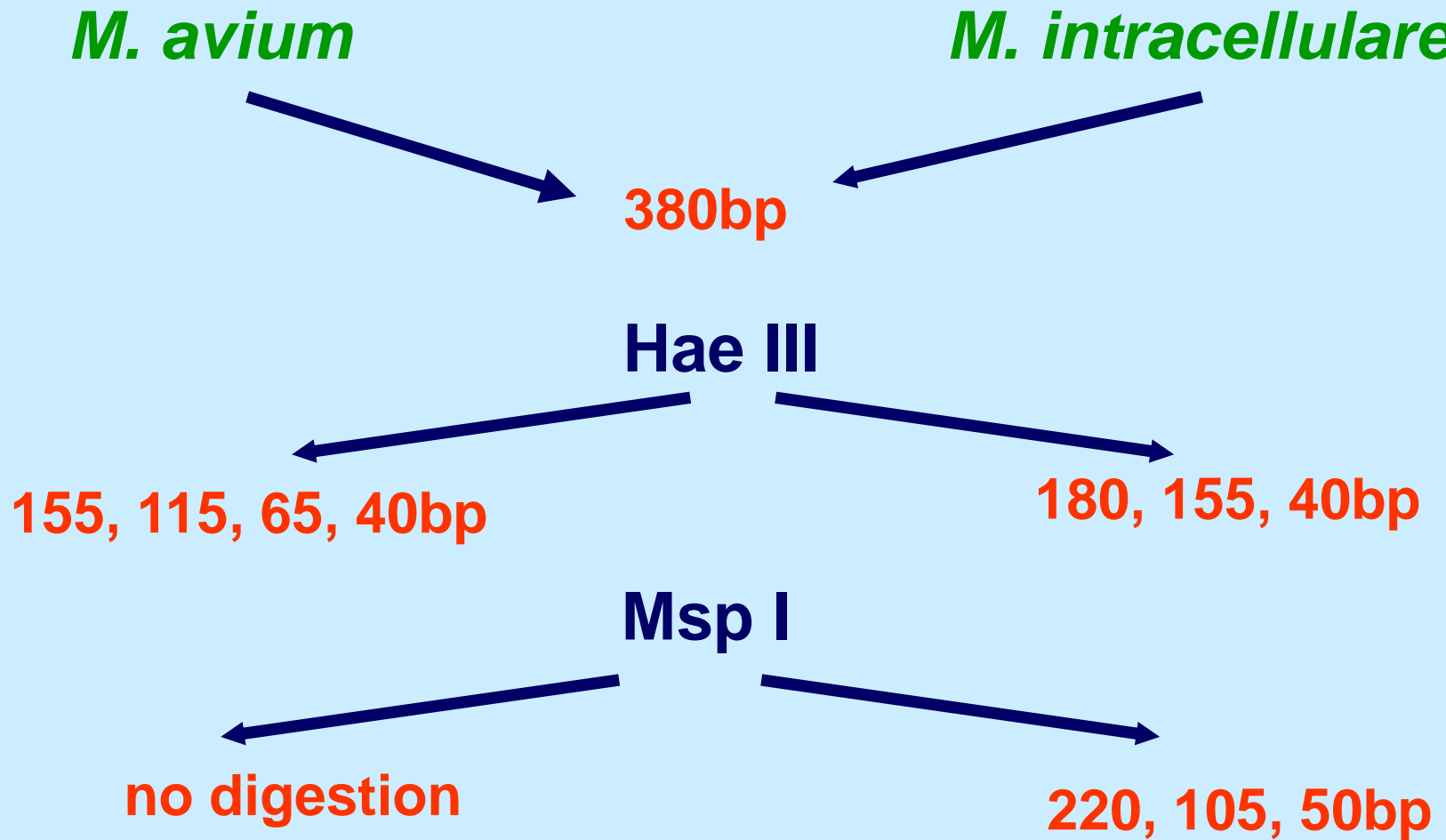


# ***Diferenciace některých mykobakterií***

mezerník 16S-23S rRNA, podle Sansila et al. 1998

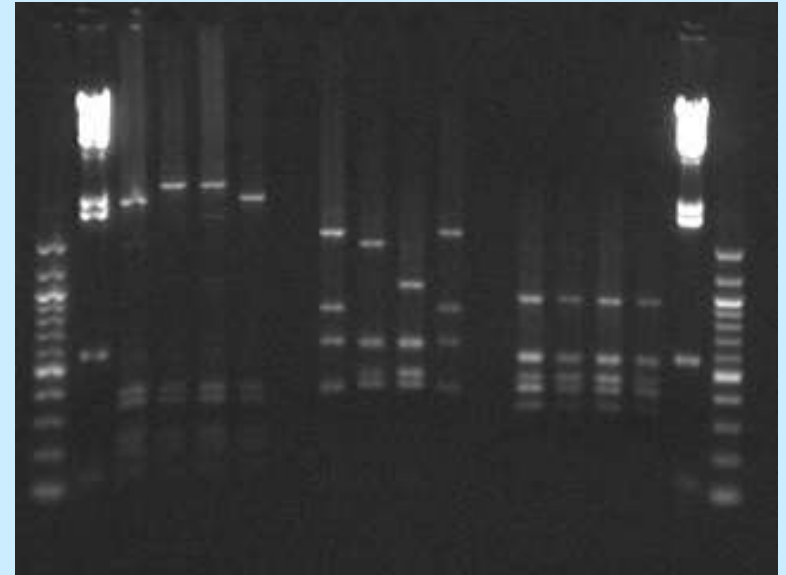
| <b>Druh</b>                       | <b>Amplikon</b> | <b>RE</b>           |
|-----------------------------------|-----------------|---------------------|
| <i>M. tuberculosis</i><br>komplex | 380             | -                   |
| <i>M. avium</i><br>komplex        | 380             | <i>HaellI, MspI</i> |
| <i>M. fortuitum</i>               | 435-480         | -                   |
| <i>M. aurum</i>                   | 490-530         | -                   |
| <i>M. flavescens</i>              | 460-500         | -                   |

# Využití mezeríku k diferenciaci MAC



# Příklad pro 16S rRNA

- Dvoustupňový identifikační protokol
- Thierry et al. 1990
- PCR produkt o délce 1 300bp
- Štěpení *RsaI* a *CfoI*



# Výsledky diferenciacie pro 16S rRNA

| <i>RsaI</i>                                 | <i>CfoI</i>  | <i>RsaI, CfoI</i>  |
|---|--|--|
| <i>M. tuberculosis</i><br><i>M. bovis</i>   | <i>M. intracellulare</i><br><i>M. goodii</i><br><i>M. ulcerans</i> | <i>Corynebacterium</i><br><i>Rhodococcus</i><br><i>Gordonia</i><br><i>Nocardia</i> |
| <i>M. avium</i><br><i>M. intracellulare</i> | -  | <i>M. ulcerans</i><br><i>M. terrae</i>   |
| <i>M. bovis</i><br><i>M. bovis caprae</i>   | <i>M. fortuitum</i><br>complex                                     | <i>M. kansasii</i><br><i>M. chelonae</i><br>serotypes                              |



# Velikosti fragmentů po štěpení RsaI

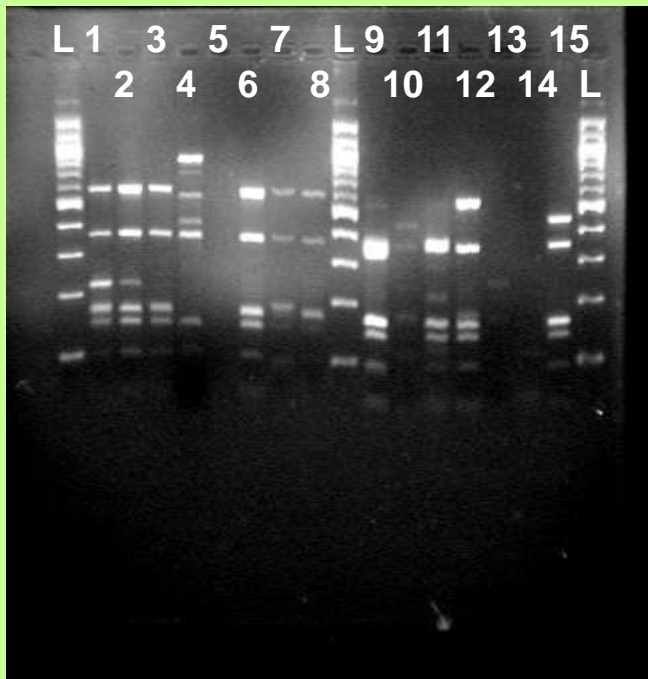
| <b>Druh</b>             | <b>Velikost fragmentů</b> |     |     |     |     |     |
|-------------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| <i>M. xenopi</i>        | 780                       |     | 355 |     |     | 113 |
| <i>M. ulcerans</i>      | 600                       | 467 |     | 167 |     |     |
| <i>M. terrae</i>        |                           | 391 | 355 | 167 | 167 | 113 |
| <i>M. parafortuitum</i> |                           | 373 | 355 | 171 | 167 | 113 |
| <i>M. flavescens</i>    |                           | 421 | 355 | 171 | 167 | 113 |
| <i>M. fortuitum</i>     |                           | 421 | 355 | 171 | 167 | 113 |
| <b>MAC</b>              | 556                       |     | 355 | 167 | 113 |     |
| <b>MTBC</b>             | 617                       |     | 355 | 171 | 167 | 113 |

# Velikosti fragmentů po štěpení Cfol

| <b>Druh</b>                       | <b>Velikost fragmentů</b> |     |     |     |     |     |
|-----------------------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| <b><i>M. terrae</i></b>           | 410                       | 337 | 314 | 252 |     |     |
| <b><i>M. parafortuitum</i></b>    | 408                       | 343 | 314 | 252 |     |     |
| <b><i>M. flavescens</i></b>       | 408                       | 337 | 253 | 225 |     |     |
| <b><i>M. fortuitum</i></b>        | 408                       |     | 253 | 225 | 190 | 145 |
| <b><i>M. avium</i></b>            | 408                       | 337 | 312 | 253 |     |     |
| <b><i>M. paratuberculosis</i></b> | 408                       | 337 | 312 | 253 |     |     |
| <b><i>M. intracellulare</i></b>   | 408                       |     | 312 | 253 | 187 | 139 |
| <b><i>M. scrofulaceum</i></b>     | 408                       |     | 309 | 253 | 187 | 150 |



Na elektroforetickém snímku jsou velikosti restrikčních fragmentů amplikonu ze 16S rRNA po štěpení restriktázou *RsaI*



Určete přibližně, z jakého druhu bakterie pocházela DNA

L = velikostní standard

Délky fragmentů v L = 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200 a 1500 bp



## Řešení

1,2 = není jasné

3, 6, 7, 8, 12 = *M. tuberculosis*

4 = *M. xenopi* nedoštěpený

5, 10, 13, 14 = nelze stanovit

9 = *M. terrae*, *M. parafortuitum*

11 = *M. terrae*, *M. parafortuitum*, nedoštěpený

15 = *M. flavescens*, *M. fortuitum*



## Řešení – jiný zápis

1,2 = není jasné

3 = *M. tuberculosis*

4 = *M. xenopi* nedoštěpený

5 = nelze stanovit

6, 7, 8 = *M. tuberculosis*

9 = *M. terrae*, *M. parafortuitum*

10 = nelze stanovit

11 = *M. terrae*, *M. parafortuitum*, nedoštěpený

12 = *M. tuberculosis*

13, 14 = nelze stanovit

15 = *M. flavescens*, *M. fortuitum*

# Detekce genů rezistence

| Gen               | Metoda                             | K čemu  |
|-------------------|------------------------------------|---|
| <i>katG</i>       | PCR-REA, RFLP                      | INH resistance u<br><i>MTBC</i>                         |
| <i>pncA, oxyR</i> | PCR-REA<br>sekvenování<br>PCR-RFLP | rezistence k<br>pyrazinamidu<br>tuberculosis x<br>bovis |
| <i>ahpC</i>       | sekvenování                        | MDR- <i>MTB</i>   |

# **PCR-REA – závěry**

## **Výhody**

- **Jednoduchá, levná a rychlá metoda**
- **Univerzální, vhodná pro široké spektrum organismů**

## **Nevýhody**

- **Nutné mít sadu standardních druhů, poddruhů a kmenů**
- **Bodové mutace během PCR**
- **Nízká rozlišovací schopnost elektroforézy**

# ***Kdo chce vědět víc***



**Dvorska L., Bartos M., Martin G., Erler W.,  
Pavlik, I. (2001):**

**Strategies for differentiation,  
identification and typing of medically  
important species of mycobacteria by  
molecular methods.**

**Vet.Med.-Czech 46, 309-328**



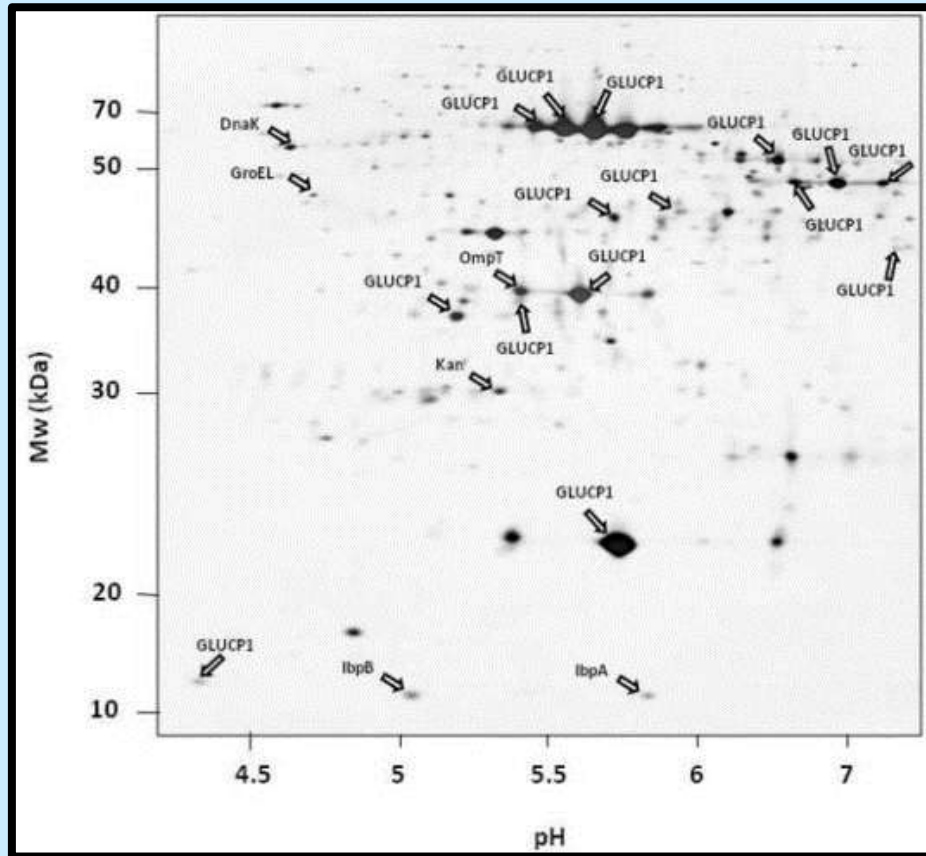
# ***Protein fingerprinting***

- **Dvourozměrná proteinová elektroforéza**
- **Nejnověji hmotnostní spektrofotometrie**



# Příklad 2D elektroforézy

*E. coli* FtsH deficientní kmen produkující  $\alpha$ -glukozidázu



Jürgen, B. et al.: (2010): Quality control of inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories* 2010, 9:41

# ***Protein mass fingerprinting***

**Analytická metoda pro identifikaci proteinů  
vyvinutá v roce 1993**

- **Protein je nejprve štěpen na menší peptidy**
- **Jejich hmotnost je změřena hmotnostním spektrofotometrem (MALDI-TOF, ESI-TOF)**
- **Následuje porovnání výsledných hmotností s databází hmotností referenčních peptidů**

# ***Protein mass fingerprinting***



**Proboha jak?**

**Srovnávací vzorek referenčních peptidů lze  
připravit rovněž *in silico* !**



# *In silico* příprava referenčních peptidů

ATG CAA TAG TTC AAG AAA GAT AGT TAA



Translace *in silico*

Met-Leu-Cys-Thr-Asp-Gln-His-Ile



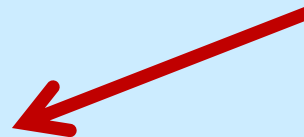
Specifické štěpení  
známou proteázou

Met-Leu-Cys-Thr

Asp-Gln-His-Ile



Výpočet molekulové  
hmotnosti



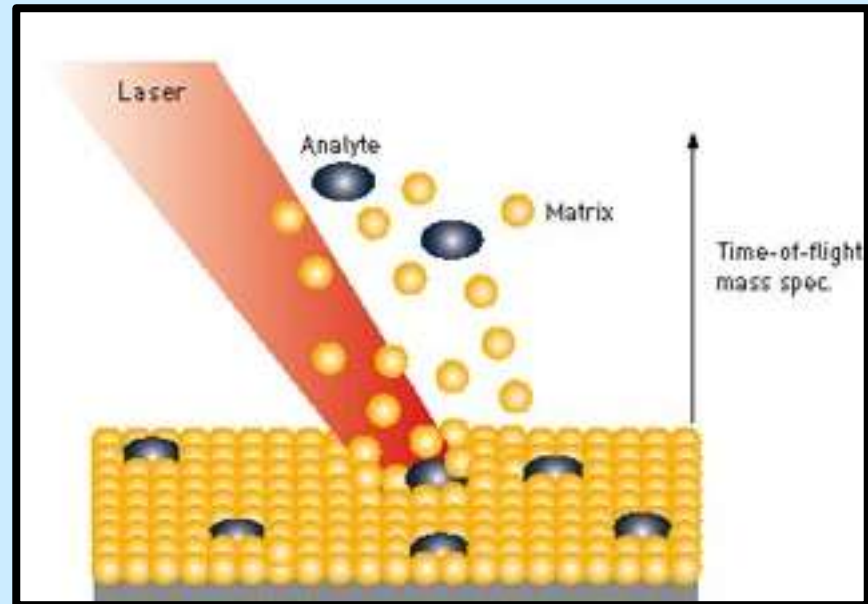
Porovnání se  
vzorkem



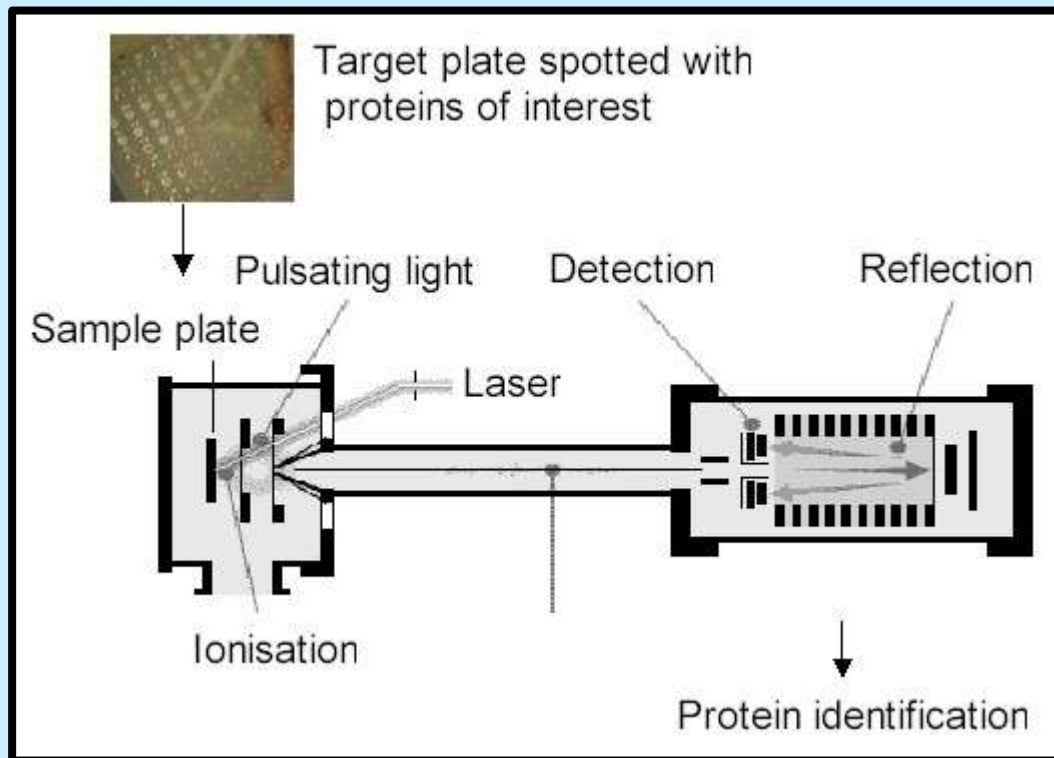
# Princip MALDI-TOF

matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight

- varianta hmotnostní spektrofotometrie
- peptidy jsou ionizovány a stanoví se poměr hmoty k náboji na základě doby letu (time-of-flight) k detektoru
- vypočte se  $M$  a ta je specifická pro každou aminokyselinu



# Schéma zařízení





# *Výhody a nevýhody*



- 1) **Není zapotřebí sekvenovat proteiny**
- 2) **Stačí jen znalost molekulové hmotnosti**

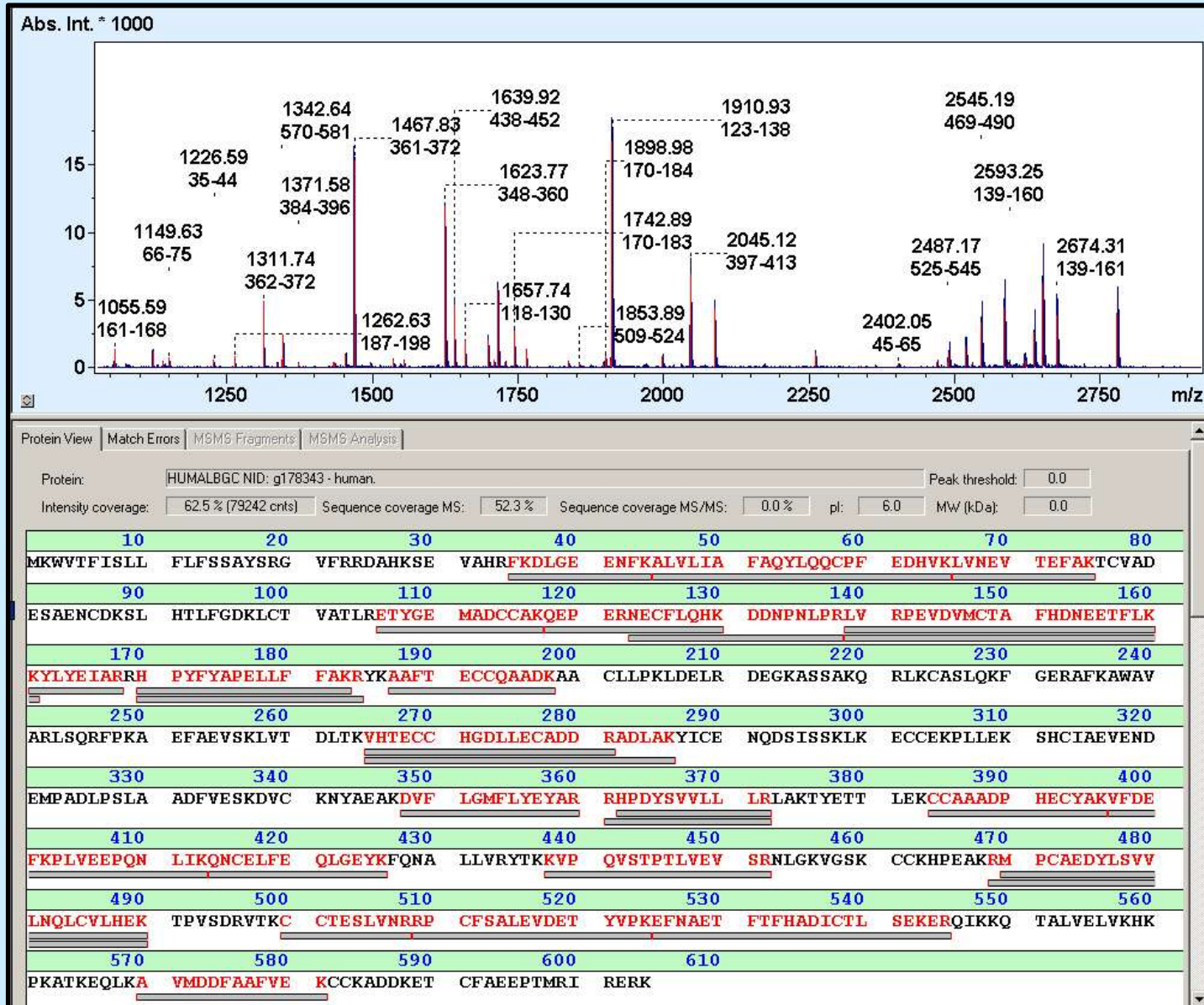


- 1) **Nelze analyzovat multimerní proteiny**
- 2) **Vzorky se izolují z SDS-PAGE**

# ***Příprava vzorku pro spektrofotometrii***

- 1) SDS-PAGE**
- 2) Chemická modifikace – odbourání disulfidických můstků, karboxymetylace cysteinů**
- 3) Štěpení proteázami**
- 4) Extrakce peptidů acetonitrilem a vakuové vysušení**
- 5) Rozpuštění ve vodě**
- 6) Purifikace a úprava pro spektrofotometrii**

# Výsledek MALDI-TOF



# ***Shrnutí***

- 1) Přehled a funkce enzymů**
- 2) Restrikční endonukleázy – opakování**
- 3) Restrikční mapy**
- 4) Detekce polymorfismů v genomech**
- 5) DNA fingerprinty**
- 6) Proteinové fingerprinty**